

INTERNATIONAL COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C. 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 13 December 1999 (13.12.99)	
International application No. PCT/ES99/00134	Applicant's or agent's file reference PCT-51
International filing date (day/month/year) 13 May 1999 (13.05.99)	Priority date (day/month/year) 13 May 1998 (13.05.98)
Applicant PRIETO VALTUEÑA, Jesús et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

18 November 1999 (18.11.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Olivia RANAIVOJAONA

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference PCT-51	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/ES99/00134	International filing date (day/month/year) 13/05/1999	Priority date (day/month/year) 13/05/1998
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K38/21		
Applicant INSTITUTO CIENTIFICO Y TECNOLOGICO DE... et al.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.



2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

- ☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 9 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 18/11/1999	Date of completion of this report 14.03.2000
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2339 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2339 - 4465	Authorized officer Winger, R Telephone No. +49 89 2399.8129 

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/ES99/00134

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of (*substitute sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

Description, pages:

1-5,9-11	as originally filed		
6,8,12-16	as received on	11/04/2000	with letter of 10/04/2000
7	with telefax of	27/07/2000	

Claims, No.:

1-9	with telefax of	27/07/2000
-----	-----------------	------------

Drawings, sheets:

1/3-3/3	as originally filed
---------	---------------------

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages:
- ☐ the claims, Nos.:
- ☐ the drawings, sheets:

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)):

4. Additional observations, if necessary:

see separate sheet

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No. PCT/ES99/00134

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 1-9 .

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 1-9 (in part) relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

see separate sheet

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☐ no international search report has been established for the said claims Nos. .

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	1-9
	No:	Claims	
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	1-9
	No:	Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-9
	No:	Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

s separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/ES99/00134

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/ES99/00134

Re Section I

Basis of the Report

1. The International Preliminary Examination Report is also based on 1 page of sequence listing ("List of Sequences").

Re Section III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

2. Contrary to the requirements of Rule 5.1(a)(v) PCT, the best mode for carrying out the invention is not set forth in the description. Where the national law of the designated State does not require the description of the best mode, failure to describe it shall have no effect in that State.

Re Section V

Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

3. Prior Art: Reference is made to the following documents cited in the International Search Report

D1: Journal of Interferon and Cytokine Research 16 (1996), 1027-1033

D2: The New England Journal of Medicine 321 (1989), 1501-1506

4. Novelty and Inventive Step: The subject-matter of claims 1-9 seems to be novel and inventive

The present application relates to the treatment of viral liver diseases. From prior art document D2 it is known that hepatitis C can be treated by recombinant IFN- α 2b. Moreover, D1 shows in vitro (in human liver tumour cell lines) that IFN- α 5 has stronger antiviral activity against EMC virus than IFN- α 2 (p 1029, Figure 1). However, the results of the latter document do not show any preference for certain tissues and the role of each of the type I IFN remains obscure (p 1032, right column).

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/ES99/00134

Thus, on the basis of D1 and D2, the problem to be solved by the present invention may be regarded as finding out whether or not IFN- α 5 has a preference for a particular tissue. As it has been shown, that there is a marked reduction in the expression of IFN- α 5 in liver tissue in case of HCV infection, which could not have been expected, the subject-matter of claim 1 and dependent claims 2-9 seems to be inventive.

5. Industrial Applicability:

Claims 1-9 relate to the use of IFN- α 5 in the production of compositions useful for the treatment of liver disease, which is industrially applicable under Article 33(4) PCT.

Re Section VII

Certain defects in the international application

6. There seem to be various (clerical) errors in the description resulting from the translation, e.g., p 9 (l 5, l 14), p 10 (l 19).

Re Section VIII

Certain observations on the international application

7. The main feature of independent claim 1, the production of compositions useful for treatment of liver diseases as well as the additional features in the dependent claims 2-9 are not referred to in the description. Claims 1-9 are therefore not supported by the description as required by Article 6 PCT.

PATENT COOPERATION TREATY

Entrada	16.08.00	788861	U013039
ACH			

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

JL

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Rule 71.1)

To: ELZABURU S.A. Miguel Angel, 21 28010 Madrid ESPAGNE

Date of mailing (day/month/year)	14.08.2000
-------------------------------------	------------

Applicant's or agent's file reference PCT-51	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/ES99/00134	International filing date (day/month/year) 13/05/1999
Priority date (day/month/year) 13/05/1998	
Applicant INSTITUTO CIENTIFICO Y TECNOLOGICO DE... et al.	

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.

2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.

3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

Name and mailing address of the IPEA/ <div style="display: flex; align-items: center;"> <div> European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465 </div> </div>	Authorized officer Hundt, D Tel. +49 89 2399-8042
--	---



WRITTEN OPINION

International application No. PCT/ES99/00134

I. Basis of the opinion

1. This opinion has been drawn on the basis of (*substitute sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this opinion as "originally filed".*):

Description, pages:

1-16 as originally filed

Claims, No.:

1-10 as originally filed

Drawings, sheets:

1/3-3/3 as originally filed

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages:

☐ the claims, Nos.:

☐ the drawings, sheets:

3. This opinion has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)):

4. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims
Inventive step (IS)	Claims 1-10: No
Industrial applicability (IA)	Claims

2. Citations and explanations

se separate sheet

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

see separate sheet

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Re Section V

Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. **Prior Art:** Reference is made to the following documents cited in the International Search Report
D1: Journal of Interferon and Cytokine Research 16 (1996), 1027-1033
D2: The New England Journal of Medicine 321 (1989), 1501-1506
2. **Novelty:** The subject-matter of claims 1-10 seems to be novel
3. **Inventive Step:** The subject-matter of claims 1-10 does not seem to be inventive

The present application relates to the treatment of viral liver diseases. From prior art document D2 it is known that hepatitis C can be treated by IFN- α 2b. Moreover, D1 shows in vitro (in human liver tumour cell lines) that IFN- α 5 has stronger antiviral activity than IFN- α 2 (p 1029, Figure 1).

Thus, on the basis of D1 and D2, the problem to be solved by the present invention may be regarded as finding out whether or not IFN- α 5 has also an in vivo activity against viral liver diseases. However, it has not been shown in the present application that IFN- α 5 has such an activity and consequently there is no indication for the presence of an inventive step.

Re Section VII

Certain defects in the international application

4. There seem to be various (clerical) errors in the description resulting from the translation, e.g., dioxynucleotides, VHC, RNAm, p 9 (I 5, I 14), p 10 (I 19).

Re Section VIII

Certain observations on the international application

5. The term "essentially derived gene sequences" used in claim 1 is vague and unclear and leaves the reader in doubt as to the meaning of the technical feature to which it refers, thereby rendering the definition of the subject-matter of said claim unclear (Article 6 PCT).

6. The main feature of independent claim 1, the manufacture of compositions useful in the treatment of liver diseases as well as the additional features in the dependent claims 2-5 and 9-10 are not referred to in the description. Claims 1-10 are therefore not supported by the description as required by Article 6 PCT.
7. The term "to genetically induce physiological synthesis" is not considered a technical feature as it relates to a mechanism of action, but not to a specific therapeutic application.
8. Dependent claims 6-8 are unclear, because they seem to relate to a process for the production of IFN- α 5 which is not within the scope of claim 1.
9. The term "composition for somatic gene therapy" is unclear, because it is not defined in the description which further ingredients should be combined with the sequence coding for IFN- α 5.

Addendum

10. In order to facilitate the examination of the conformity of the amended application with the requirements of Article 34(2)(b) PCT, the applicant is requested to clearly identify the amendments carried out, no matter whether they concern amendments by addition, replacement or deletion, and to indicate the passages of the application as filed on which these amendments are based (see also Rule 66.8(a) PCT).

If the applicant regards it as appropriate these indications could be submitted in handwritten form on a copy of the relevant parts of the application as filed.

ATENT COOPERATION TREATY

U013039-2

From the:
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:

ELZABURU MARQUEZ, Alberto
Miguel Angel, 21
E-28010 Madrid
ESPAGNE

ELZABURU			
En			
31.01.00	05959		
ACM			

PCT

WRITTEN OPINION

(PCT Rule 66)

Date of mailing
(day/month/year)

28.01.00

Applicant's or agent's file reference

PCT-51

REPLY DUE

within 3 month(s)
from the above date of mailing

International application No.

PCT/ES99/00134

International filing date (day/month/year)

13/05/1999

Priority date (day/month/year)

13/05/1998

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC

A61K38/21

Applicant

INSTITUTO CIENTIFICO Y TECNOLOGICO DE... et al.

1. This written opinion is the first drawn up by this International Preliminary Examining Authority.

2. This opinion contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the opinion
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain document cited
- VII ☒ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

3. The applicant is hereby invited to reply to this opinion.

When? See the time limit indicated above. The applicant may, before the expiration of that time limit, request this Authority to grant an extension, see Rule 66.2(d).

How? By submitting a written reply, accompanied, where appropriate, by amendments, according to Rule 66.3. For the form and the language of the amendments, see Rules 66.8 and 66.9.

Also: For an additional opportunity to submit amendments, see Rule 66.4.
For the examiner's obligation to consider amendments and/or arguments, see Rule 66.4 bis.
For an informal communication with the examiner, see Rule 66.6.

If no reply is filed, the international preliminary examination report will be established on the basis of this opinion.

4. The final date by which the international preliminary examination report must be established according to Rule 69.2 is: 13/09/2000.

Name and mailing address of the international preliminary examining authority:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized officer / Examiner

Winger, R

Formalities officer (incl. extension of time limits)

Senkel, H
Telephone No. +49 89 2399 8071



WRITTEN OPINION

International application No. PCT/ES99/00134

I. Basis of the opinion

1. This opinion has been drawn on the basis of (*substitute sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this opinion as "originally filed"*):

Description, pages:

1-5,7,9-11	as originally filed			
6,8,12-16	as received on	11/04/2000	with letter of	10/04/2000

Claims, No.:

1-9	as received on	11/04/2000	with letter of	10/04/2000
-----	----------------	------------	----------------	------------

Drawings, sheets:

1/3-3/3	as originally filed
---------	---------------------

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages:
☒ the claims, Nos.:
☐ the drawings, sheets:

3. This opinion has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)):

see separate sheet

4. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims
Inventive step (IS)	Claims 1-9: No
Industrial applicability (IA)	Claims

2. Citations and explanations

see separate sheet

VII. Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

see separate sheet

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Re Section I

1. Amended claims 1, 5, and 9 filed with the letter dated 10.04.2000 seem to introduce subject-matter which extends beyond the application as filed, contrary to Article 34(2)(b) PCT. The amendments concerned are "any isolated DNA sequence coding for IFN- α 5" and "comprises an IFN- α 5 recombinant protein".

Re Section V

2. In response to the remarks and amendments made by the Applicant the objections raised in the first Written Opinion are upheld.
3. With regard to the objections dealt with by the Applicant, the following is to be noted: The problem to be solved is to use IFN- α 5 against viral liver diseases and not to show "that IFN- α 5 levels are reduced in liver tissue of patients suffering for chronic hepatitis C of viral origin".

Re Section VII

4. There seem to be various (clerical) errors in the description resulting from the translation, e.g., dioxyribonucleotides, p 9 (I 5, I 14), p 10 (I 19).

Re Section VIII

Certain observations on the international application

5. The main feature of independent claim 1, the manufacture of compositions useful in the treatment of liver diseases as well as the additional features in the dependent claims 2-9 are not referred to in the description. Claims 1-9 are therefore not supported by the description as required by Article 6 PCT.

of normal liver obtained by laparotomy from 12 control patients (9 men and 3 women, age range 49 to 70 years). The laparotomies were performed on account of the presence of digestive tumours in 10 patients (4 colo-rectal, 5 gastric and 1 pancreatic) due to chronic pancreatitis in 1 patient and the presence of a hydatid cyst in another patient. Liver histology was normal in the twelve cases. None of these control cases had received treatment before the liver sample was obtained.

~~mRNA~~ ^{mRNA} levels of IFN α and IFN β were also determined in PBMC in 25 patients with chronic hepatitis C (14 men and 11 women, age range 24 to 69 years) (four of these patients had cirrhosis) and in PBMC from 23 healthy controls (10 men and 13 women, age range from 25 to 66 years). The viral genotype for these patients was 1b in 22 patients, 1a in two patients and 3 in 1 patient.

The diagnosis of chronic hepatitis C was based on an increase in serum transaminases lasting more than 6 months, a positive result for anti-HCV antibodies (2nd generation ELISA, Ortho Diagnostic System, Raritan, NJ, USA), the presence of C virus RNA in serum (reverse-reaction transcription in the polymerase chain), and histological evidence of chronic hepatitis. The severity of liver damage was evaluated using the Knodell index (16). Other causes of chronic hepatitis other than hepatitis C virus were ruled out. None of the patients had received treatment with IFN α during at least 6 months prior to the study.

Preparation of liver, PBMC and serum samples

The liver samples were obtained by liver biopsy using a Tru-Cut biopsy needle (Baxter, Deerfield, IL). One third of the sample was immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until total RNA extraction took place. The remainder of the sample was used for the histological investigation.

PBMC were isolated from heparinized blood using a density gradient with Lymphoprep (Nycomed Pharma As, Oslo, Norway), centrifuged at 600 g for 30 minutes. After centrifuging the PBMC were collected, washed 5 times with 0.9% NaCl and lysed using Ultraspec™ protein denaturing solution (Biotech Laboratories, Houston, USA). The cellular lysate was kept at -80°C until total RNA extraction was performed using the method of Chomczynski and Sacchi (17).

and β -actin was amplified by reacting 18 or 25 cycles (PBMC or liver respectively) (94°C, 55°C and 72°C for 20, 15 and 30 seconds for each step respectively), protocols which avoid interference with the PCR reaction saturation stage. The oligonucleotides (5'-3') d(TCCATGAGATGATCCAGCAG) and d(ATTCTGCTCTGACAACCTCCC) were used as direction and antirection primers respectively to amplify a fragment of 274 pairs of bases located between nucleotides 240-514 in the human IFN α gene (19). These oligonucleotides are direction primers designed to amplify all the subtypes of IFN α . The oligonucleotides d(TCTAGCACTGGCTGGAATGAG) and d(GTTTCGGAGGTAACCTGTAAG) were the primers used to amplify a fragment of 276 base pairs located between nucleotides 349-625 of cDNA of human IFN β (20). d(TCTACAATGAGCTGCGTGTG) and d(GGTGAGGATCTTCATGAGGT) were the primers used to amplify a fragment of 314 base pairs (nucleotides 1319-2079) of the β -actin gene (21).

After the amplification reactions 20 μ l of the PCR product were run in a 2% agarose gel containing ethidium bromide. The bands obtained were displayed using an ultraviolet lamp and were analysed using a commercial programme (Molecular Analyst/PC, Bio-Rad) capable of digitizing and analysing the image obtained. Finally the values corresponding to the expression of the IFN α and IFN β genes were standardized with their β -actin correlates. The results are expressed as the quotient between the value of IFN α and IFN β and the β -actin correlate. Previously we demonstrated that the ~~RNA~~^{mRNA} of β -actin was expressed constantly both in the liver and in the PBMC of patients with chronic hepatitis C (22), which has enabled us to standardize IFN α and IFN β values with those obtained for β -actin.

Validation curves for the PCR technique were prepared using known quantities of total RNA (from 0 up to 1 μ g). As will be seen in Figure 3, with the total initial RNA quantities used for IFN α , IFN β and β -actin (0.5 μ g, for both the liver and PBMC), we were within the linear range of the PCR amplification curve. The inter-test coefficient of variance for IFN α / β -actin was 22% and for IFN β / β -actin it was 24%. The identity of the PCR product obtained was checked for IFN α and IFN β by automatic sequencing (ABI prism™ 310 genetic analyser, Perkin Elmer).

IFN α subtypes in normal liver tissue and PBMC in healthy individuals

After extraction of the total RNA of the normal liver tissue samples the ~~RNA~~^{mRNA} of the IFN α was amplified using universal primers for all the IFN α subtypes. The PCR amplification products were then cloned and sequenced. 41 clones from 4 different normal livers were analysed and we observed that the IFN α sequence in the 41 clones was the same and corresponded to the IFN α 5 subtype (Table 1). These results show that IFN α 5 is the only IFN α subtype expressed in normal liver. The partial cDNA sequence of the IFN α 5 obtained from all the clones was shown to be SEQ ID NO:1.

To compare the profile of the IFN subtypes expressed in the liver with that expressed in PBMC the total RNA of the PBMC from 5 healthy controls was extracted and the IFN α ~~RNA~~^{mRNA} was amplified with the universal primers for all the IFN α subtypes. Of the 43 clones analysed, 15 corresponded to the IFN α 5 subtype, 14 to the IFN α 1/13, 6 to the IFN α 21 and 8 clones to other IFN α subtypes (Table 1). These results indicate that the IFN α subtype profile expressed in PBMC differs from that expressed in normal liver.

IFN α subtypes in liver tissue and PBMC from patients with chronic hepatitis C

The above results show that the normal liver expresses IFN α 5, while PBMC express a variety of IFN α subtypes. In the liver parenchyma of patients with chronic hepatitis C there is mononuclear cell infiltrate, an important source of IFN α . This suggests that the profile of IFN α subtypes expressed by the liver in patients with chronic hepatitis C might differ from the profile found in normal liver. To investigate the expression of IFN α subtypes in chronic hepatitis C we extracted the total RNA from liver samples from 3 different patients and 2 PBMC samples. After amplifying the IFN α RNA~~m~~ with universal primers for all subtypes, we cloned and sequenced 24 clones of liver tissue and 18 clones of PBMC. As shown in Table 1, the PBMC from patients with chronic hepatitis C expressed IFN α 21, IFN α 5 and IFN α 7 (5, 12, and 1 clones respectively). In the liver tissue from these patients we found subtypes IFN α 21, IFN α 17 and IFN α 1/13 (8, 1 and 2 clones respectively) in addition to the IFN α 5 subtype (Table 1).

These data suggest that the production of IFN α by the mononuclear cell infiltrate can cause

a change in the profile of IFN α subtypes expressed in the liver tissue of patients with chronic hepatitis C.

Levels of expression of IFN α ^{mRNA} ~~RNA~~ in PBMC and the liver of patients with chronic hepatitis C and controls

5 Total RNA was extracted from PBMC and liver samples from patients with chronic hepatitis C (n=25 and 16, respectively), PBMC samples from healthy controls (n=20) and normal liver tissue samples obtained by laparotomy (n=12). The ^{mRNA} ~~RNA~~ levels of IFN α were determined using the semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique using universal primers to amplify all the IFN α subtypes. The values
10 are expressed as the ratio of IFN α ^{mRNA} ~~RNA~~ to β -actin ^{mRNA} ~~RNA~~.

We found that the levels of expression of IFN α in the PMBC of patients with chronic hepatitis C were significantly increased in comparison with those found in healthy controls (3.2 ± 0.48 against 1.14 ± 0.26 ; $p=0.001$) (Figure 1A). This result was expected in a viral infection such as hepatitis C in which the PBMC are infected (14). On the other hand the
15 levels of expression of IFN α ^{mRNA} ~~RNA~~ were significantly reduced in the liver tissue from patients with chronic hepatitis C in comparison with that expressed in normal liver (0.12 ± 0.03 against 0.43 ± 0.12 ; $p=0.003$) (Figure 1B).

As observed previously, IFN $\alpha 5$ is the only IFN α subtype detected in normal liver, while a mixture of subtypes is observed in the liver tissue of patients with chronic hepatitis C. Our
20 findings indicate that in infection by HCV there is a marked reduction in the expression of the IFN α subtype normally expressed in liver tissue. Interestingly, IFN α ^{mRNA} ~~RNA~~ levels in the livers of patients with chronic hepatitis C show a direct correlation with the Knodell index ($r=0.54$; $p<0.05$). This finding, together with the observation that the IFN α subtypes detected in the livers of patients with chronic hepatitis C are those observed in
25 PBMC suggests that most of the IFN α ^{mRNA} ~~RNA~~ found in the liver in hepatitis C comes from the inflammatory infiltrate. It appears possible that the reduction in the expression of liver IFN α (IFN $\alpha 5$) may play a part in making the HCV infection chronic. As a result, these observations may have therapeutic implications if we also bear in mind the marked antiviral and antiproliferative activity of the IFN $\alpha 5$ described by other authors (9).

Levels of expression of IFN β ^{mRNA} ~~RNA~~ in the PBMC and liver of patients with chronic hepatitis C and controls

IFN β , the second majority form of type I interferon, is a glycoprotein produced by a single gene. In viral infections transcription of the IFN α and IFN β genes is activated or repressed by various mechanisms (15). To analyse the expression of IFN β in chronic hepatitis C we determined IFN β ^{mRNA} ~~RNA~~ levels in the same samples of liver tissue and PBMC previously used to determine the expression of IFN α .

As shown in Figure 2, we observed that IFN β ^{mRNA} ~~RNA~~ levels (expressed as a ratio against β -actin) were significantly higher in both PBMC and the liver in patients with chronic hepatitis C in comparison with the PBMC findings in healthy controls and normal livers (1.66 ± 0.2 against 0.88 ± 0.16 ; $p=0.008$ in PBMC and 1.37 ± 0.23 against 0.97 ± 0.16 ; $p=0.011$ in liver). These results show that while HCV causes IFN α to be repressed in the liver, the expression of IFN β is increased in both the liver and PBMC. This indicates that ^{HCV} ~~VHC~~ modulates the different type I IFN genes in the liver in a different way, and blocks the production of IFN α to permit the overexpression of IFN β .

Relationship between the expression of IFN α and IFN β genes with viral load, genotype and liver damage in chronic hepatitis C

In order to determine whether the expression of the IFN α or IFN β genes can be related to viral load or genotype we quantified the C virus RNA in the serum of all patients using the competitive PCR technique and determined the ^{HCV} ~~VHC~~ genotype using a hybridization method with specific test materials. We found no correlation between the expression of the IFN α or IFN β genes (in the liver or PBMC) and C virus RNA levels in serum or the viral genotype.

Analysing the relationship between the expression of the type I IFN genes and the severity of liver damage in patients with chronic hepatitis C we found that IFN β ^{mRNA} ~~RNA~~ levels in the liver correlated directly with serum aspartate aminotransferase values ($r=0.64$, $p=0.008$) and the Knodell index ($r=0.66$, $p=0.006$). Likewise the IFN α ^{mRNA} ~~RNA~~ values in the liver showed a direct positive correlation with the Knodell index as mentioned previously.

Table 1. IFN α subtypes in controls and patients with chronic hepatitis C.

	<i>Liver</i>	<i>PBMC</i>
Control 1	9 IFNA5 clones	
Control 2	9 IFNA5 clones	
Control 3	11 IFNA5 clones	
Control 4	12 IFNA5 clones	
Control 5		3 IFNA5 clones 4 IFNA21 clones 2 IFNA1 clones
Control 6		8 IFNA5 clones
Control 7		10 IFNA1/13 clones 1 IFNA8 clone
Control 8		3 IFNA5 clones 2 IFNA21 clones 2 IFNA1/13 clones 1 IFNA22 clone
Control 9		2 IFNA10 clones 1 IFNA5 clone 1 IFNA2 clone 1 IFNA7 clone 1 IFNA8 clone 1 IFNA4 clone
RNA-VHC (+) 1 HCV	6 IFNA5 clones 2 IFNA21 clones 1 IFNA17 clone	7 IFNA5 clones 1 IFNA21 clone 1 IFNA7 clone
RNA-VHC (+) 2 HCV	2 IFNA5 clones 4 IFNA21 clones	5 IFNA5 clones 4 IFNA21 clones
RNA-VHC (+) 3 HCV	5 IFNA5 clones 2 IFNA21 clones 2 IFNA1 clones	

Description of the figures

Figure 1: Expression of alpha interferon/ β -actin ~~RNA~~^{mRNA} (ordinate) in peripheral blood mononuclear cells (A) and in the liver (B) of healthy controls and patients with chronic hepatitis C (HCV-RNA+) (abscissa).

5 **Figure 2:** Expression of beta interferon/ β -actin ~~RNA~~^{mRNA} (ordinate) in peripheral blood mononuclear cells (A) and in the liver (B) of healthy controls (C) and patients with chronic hepatitis C (HCV-RNA+) (abscissa).

Figure 3: Relationship between the initial quantity of total RNA (abscissa) and the strength of the PCR product band obtained by amplifying the ~~RNA~~^{mRNA} of IFN α (●), IFN β (▲) and β -actin (◆) (ordinate, as counts \times mm²) in PBMC (A) and liver (B) samples.

10

SECOND AMENDED SET OF CLAIMS

1. Use of IFN-alpha 5 or the gen sequence coding for IFN-alpha 5 in the production of compositions useful for treatment of liver diseases.
2. Use according to claim 1 wherein those compositions are useful against chronic hepatitis C.
3. Use according to claim 1 wherein those compositions are useful against cirrhosis of viral original.
4. Use according to claim 1 wherein those compositions are useful against hepatocellular carcinoma.
5. Use according to anyone of claims 1-4 in which the composition comprises an IFN-alpha 5 recombinant protein obtained by cloning in a suitable host an expression vector comprising the gen sequence coding for IFN-alpha 5.
6. Use according to claim 5 wherein in which the cloned host is a eucaryote organism, preferably *Escherichia coli*.
7. Use according to claim 5, in which the cloned host is a procaryote organism, preferably *Solanum tuberosum*.
8. Use according to claims 1-7 in which the composition can be included in any foodstuff.
9. Use according to claims 1-4, characterised by those compositions comprising the gen sequence coding for IFN-alpha 5 and being applied by somatic gene therapy.

AMENDED SHEET

E L 6.997.32521US

The serum samples were obtained by centrifuging from venous blood collected in sterile tubes. The serum was kept at -40°C until use.

Analysis of the expression of IFN α and IFN β genes in the liver and PBMC

RNA levels of IFN α and IFN β were determined using a quantitative polymerase chain reaction reverse transcription (RT-PCR) method using a thermocycler (Perkin-Elmer Gene Amp PCR system 2400). Prior to reverse transcription 2 μg of total RNA (from both the liver and PBMC) were treated with 1 unit of deoxyribonuclease (DNase I amplification grade, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) to eliminate possible contaminating DNA. The presence of traces of DNA was checked by including control reactions without reverse transcription. This step is required because of the absence of introns in IFN α and IFN β genes (18), which made it impossible for us to distinguish the product of PCR from the RNA or possible contaminating DNA. All the controls performed without reverse transcription were negative, indicating the absence of contaminating DNA. Total RNA was transcribed (60 minutes at 37°C) with 400 units of M-MuLV reverse transcriptase (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) in a final volume of 40 μl of $5 \times$ saline solution (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl_2), supplemented with 5 mM DTT, 0.5 mM triphosphate deoxyribonucleotides (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), 48 units of RNAsas inhibitor (Promega Corporation, MD, US) and 400 ng of random hexamers (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). After denaturing the reverse transcriptase (95°C , 1 minute) and rapidly cooling over ice, a 10 μl aliquot (0.5 μg) of the cDNA was used to amplify the IFN α and IFN β by PCR in 50 μl of $10 \times$ PCR buffer (160 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 670 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1% Tween 20) supplemented with the direction and antidirection primers (40 ng of each one for IFN α and 60 ng for IFN β), 1.2 mM MgCl_2 and 2 units of BiotaqTM DNA polymerase (Bioline, London, UK). Control reactions without RNA were performed in all the experiments. As an internal control for each sample a fragment of β -actin cDNA was amplified using a 10 μl aliquot of the cDNA obtained previously. The IFN α was amplified by performing 30 or 33 cycles (PBMC or liver respectively) (94°C , 60°C and 72°C during 20, 15 and 30 seconds for each step respectively), the IFN β was amplified by performing 30 or 35 cycles (PBMC or liver respectively) (94°C , 58°C and 72°C for 20, 15 and 30 seconds for each step respectively)

of normal liver obtained by laparotomy from 12 control patients (9 men and 3 women, age range 49 to 70 years). The laparotomies were performed on account of the presence of digestive tumours in 10 patients (4 colo-rectal, 5 gastric and 1 pancreatic) due to chronic pancreatitis in 1 patient and the presence of a hydatid cyst in another patient. Liver histology was normal in the twelve cases. None of these control cases had received treatment before the liver sample was obtained.

^{mRNA}
~~RNA~~ levels of IFN α and IFN β were also determined in PBMC in 25 patients with chronic hepatitis C (14 men and 11 women, age range 24 to 69 years) (four of these patients had cirrhosis) and in PBMC from 23 healthy controls (10 men and 13 women, age range from 25 to 66 years). The viral genotype for these patients was 1b in 22 patients, 1a in two patients and 3 in 1 patient.

The diagnosis of chronic hepatitis C was based on an increase in serum transaminases lasting more than 6 months, a positive result for anti-HCV antibodies (2nd generation ELISA, Ortho Diagnostic System, Raritan, NJ, USA), the presence of C virus RNA in serum (reverse-reaction transcription in the polymerase chain), and histological evidence of chronic hepatitis. The severity of liver damage was evaluated using the Knodell index (16). Other causes of chronic hepatitis other than hepatitis C virus were ruled out. None of the patients had received treatment with IFN α during at least 6 months prior to the study.

Preparation of liver, PBMC and serum samples

The liver samples were obtained by liver biopsy using a Tru-Cut biopsy needle (Baxter, Deerfield, IL). One third of the sample was immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C until total RNA extraction took place. The remainder of the sample was used for the histological investigation.

PBMC were isolated from heparinized blood using a density gradient with Lymphoprep (Nycomed Pharma As, Oslo, Norway), centrifuged at 600 g for 30 minutes. After centrifuging the PBMC were collected, washed 5 times with 0.9% NaCl and lysed using UltraspecTM protein denaturing solution (Biotech Laboratories, Houston, USA). The cellular lysate was kept at -80°C until total RNA extraction was performed using the method of Chomczynski and Sacchi (17).

AMENDED SHEET

and β -actin was amplified by reacting 18 or 25 cycles (PBMC or liver respectively) (94°C, 55°C and 72°C for 20, 15 and 30 seconds for each step respectively), protocols which avoid interference with the PCR reaction saturation stage. The oligonucleotides (5'-3') d(TCCATGAGATGATCCAGCAG) and d(ATTCTGCTCTGACAACCTCCC) were used as direction and antidirection primers respectively to amplify a fragment of 274 pairs of bases located between nucleotides 240-514 in the human IFN α gene (19). These oligonucleotides are direction primers designed to amplify all the subtypes of IFN α . The oligonucleotides d(TCTAGCACTGGCTGGAATGAG) and d(GTTTCGGAGGTAACTGTAAG) were the primers used to amplify a fragment of 276 base pairs located between nucleotides 349-625 of cDNA of human IFN β (20). d(TCTACAATGAGCTGCGTGTG) and d(GGTGAGGATCTTCATGAGGT) were the primers used to amplify a fragment of 314 base pairs (nucleotides 1319-2079) of the β -actin gene (21).

After the amplification reactions 20 μ l of the PCR product were run in a 2% agarose gel containing ethidium bromide. The bands obtained were displayed using an ultraviolet lamp and were analysed using a commercial programme (Molecular Analyst/PC, Bio-Rad) capable of digitizing and analysing the image obtained. Finally the values corresponding to the expression of the IFN α and IFN β genes were standardized with their β -actin correlates.

The results are expressed as the quotient between the value of IFN α and IFN β and the β -actin correlate. Previously we demonstrated that the ~~RNA~~^{mRNA} of β -actin was expressed constantly both in the liver and in the PBMC of patients with chronic hepatitis C (22), which has enabled us to standardize IFN α and IFN β values with those obtained for β -actin.

Validation curves for the PCR technique were prepared using known quantities of total RNA (from 0 up to 1 μ g). As will be seen in Figure 3, with the total initial RNA quantities used for IFN α , IFN β and β -actin (0.5 μ g, for both the liver and PBMC), we were within the linear range of the PCR amplification curve. The inter-test coefficient of variance for IFN α / β -actin was 22% and for IFN β / β -actin it was 24%. The identity of the PCR product obtained was checked for IFN α and IFN β by automatic sequencing (ABI prism™ 310 genetic analyser, Perkin Elmer).

IFN α subtypes in normal liver tissue and PBMC in healthy individuals

After extraction of the total RNA of the normal liver tissue samples the ~~RNA~~^{mRNA} of the IFN α was amplified using universal primers for all the IFN α subtypes. The PCR amplification products were then cloned and sequenced. 41 clones from 4 different normal livers were analysed and we observed that the IFN α sequence in the 41 clones was the same and corresponded to the IFN α 5 subtype (Table 1). These results show that IFN α 5 is the only IFN α subtype expressed in normal liver. The partial cDNA sequence of the IFN α 5 obtained from all the clones was shown to be SEQ ID NO:1.

To compare the profile of the IFN subtypes expressed in the liver with that expressed in PBMC the total RNA of the PBMC from 5 healthy controls was extracted and the IFN α ~~RNA~~^{mRNA} was amplified with the universal primers for all the IFN α subtypes. Of the 43 clones analysed, 15 corresponded to the IFN α 5 subtype, 14 to the IFN α 1/13, 6 to the IFN α 21 and 8 clones to other IFN α subtypes (Table 1). These results indicate that the IFN α subtype profile expressed in PBMC differs from that expressed in normal liver.

IFN α subtypes in liver tissue and PBMC from patients with chronic hepatitis C

The above results show that the normal liver expresses IFN α 5, while PBMC express a variety of IFN α subtypes. In the liver parenchyma of patients with chronic hepatitis C there is mononuclear cell infiltrate, an important source of IFN α . This suggests that the profile of IFN α subtypes expressed by the liver in patients with chronic hepatitis C might differ from the profile found in normal liver. To investigate the expression of IFN α subtypes in chronic hepatitis C we extracted the total RNA from liver samples from 3 different patients and 2 PBMC samples. After amplifying the IFN α RNA^m with universal primers for all subtypes, we cloned and sequenced 24 clones of liver tissue and 18 clones of PBMC. As shown in Table 1, the PBMC from patients with chronic hepatitis C expressed IFN α 21, IFN α 5 and IFN α 7 (5, 12, and 1 clones respectively). In the liver tissue from these patients we found subtypes IFN α 21, IFN α 17 and IFN α 1/13 (8, 1 and 2 clones respectively) in addition to the IFN α 5 subtype (Table 1).

These data suggest that the production of IFN α by the mononuclear cell infiltrate can cause

a change in the profile of IFN α subtypes expressed in the liver tissue of patients with chronic hepatitis C.

Levels of expression of IFN α ^{mRNA} ~~RNA~~ in PBMC and the liver of patients with chronic hepatitis C and controls

5 Total RNA was extracted from PBMC and liver samples from patients with chronic hepatitis C (n=25 and 16, respectively), PBMC samples from healthy controls (n=20) and normal liver tissue samples obtained by laparotomy (n=12). The ^{mRNA} ~~RNA~~ levels of IFN α were determined using the semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique using universal primers to amplify all the IFN α subtypes. The values
10 are expressed as the ratio of IFN α ^{mRNA} ~~RNA~~ to β -actin ^{mRNA} ~~RNA~~.

We found that the levels of expression of IFN α in the PMBC of patients with chronic hepatitis C were significantly increased in comparison with those found in healthy controls (3.2 ± 0.48 against 1.14 ± 0.26 ; $p=0.001$) (Figure 1A). This result was expected in a viral infection such as hepatitis C in which the PBMC are infected (14). On the other hand the
15 levels of expression of IFN α ^{mRNA} ~~RNA~~ were significantly reduced in the liver tissue from patients with chronic hepatitis C in comparison with that expressed in normal liver (0.12 ± 0.03 against 0.43 ± 0.12 ; $p=0.003$) (Figure 1B).

As observed previously, IFN $\alpha 5$ is the only IFN α subtype detected in normal liver, while a mixture of subtypes is observed in the liver tissue of patients with chronic hepatitis C. Our
20 findings indicate that in infection by HCV there is a marked reduction in the expression of the IFN α subtype normally expressed in liver tissue. Interestingly, IFN α ^{mRNA} ~~RNA~~ levels in the livers of patients with chronic hepatitis C show a direct correlation with the Knodell index ($r=0.54$; $p<0.05$). This finding, together with the observation that the IFN α subtypes detected in the livers of patients with chronic hepatitis C are those observed in
25 PBMC suggests that most of the IFN α ^{mRNA} ~~RNA~~ found in the liver in hepatitis C comes from the inflammatory infiltrate. It appears possible that the reduction in the expression of liver IFN α (IFN $\alpha 5$) may play a part in making the HCV infection chronic. As a result, these observations may have therapeutic implications if we also bear in mind the marked antiviral and antiproliferative activity of the IFN $\alpha 5$ described by other authors (9).

Levels of expression of IFN β ^{mRNA} ~~RNA~~ in the PBMC and liver of patients with chronic hepatitis C and c ntrols

IFN β , the second majority form of type I interferon, is a glycoprotein produced by a single gene. In viral infections transcription of the IFN α and IFN β genes is activated or repressed
5 by various mechanisms (15). To analyse the expression of IFN β in chronic hepatitis C we determined IFN β ^{mRNA} ~~RNA~~ levels in the same samples of liver tissue and PBMC previously used to determine the expression of IFN α .

As shown in Figure 2, we observed that IFN β ^{mRNA} ~~RNA~~ levels (expressed as a ratio against β -actin) were significantly higher in both PBMC and the liver in patients with chronic
10 hepatitis C in comparison with the PBMC findings in healthy controls and normal livers (1.66 ± 0.2 against 0.88 ± 0.16 ; $p=0.008$ in PBMC and 1.37 ± 0.23 against 0.97 ± 0.16 ; $p=0.011$ in liver). These results show that while HCV causes IFN α to be repressed in the liver, the expression of IFN β is increased in both the liver and PBMC. This indicates that
15 ^{HCV} ~~VHC~~ modulates the different type I IFN genes in the liver in a different way, and blocks the production of IFN α to permit the overexpression of IFN β .

Relationship between the expression of IFN α and IFN β genes with viral load, genotype and liver damage in chronic hepatitis C

In order to determine whether the expression of the IFN α or IFN β genes can be related to viral load or genotype we quantified the C virus RNA in the serum of all patients using the
20 competitive PCR technique and determined the ^{HCV} ~~VHC~~ genotype using a hybridization method with specific test materials. We found no correlation between the expression of the IFN α or IFN β genes (in the liver or PBMC) and C virus RNA levels in serum or the viral genotype.

Analysing the relationship between the expression of the type I IFN genes and the severity
25 of liver damage in patients with chronic hepatitis C we found that IFN β ^{mRNA} ~~RNA~~ levels in the liver correlated directly with serum aspartate aminotransferase values ($r=0.64$, $p=0.008$) and the Knodell index ($r=0.66$, $p=0.006$). Likewise the IFN α ^{mRNA} ~~RNA~~ values in the liver showed a direct positive correlation with the Knodell index as mentioned previously.

Table 1. IFN α subtypes in controls and patients with chronic hepatitis C.

	<i>Liver</i>	<i>PBMC</i>
Control 1	9 IFNA5 clones	
Control 2	9 IFNA5 clones	
Control 3	11 IFNA5 clones	
Control 4	12 IFNA5 clones	
Control 5		3 IFNA5 clones 4 IFNA21 clones 2 IFNA1 clones
Control 6		8 IFNA5 clones
Control 7		10 IFNA1/13 clones 1 IFNA8 clone
Control 8		3 IFNA5 clones 2 IFNA21 clones 2 IFNA1/13 clones 1 IFNA22 clone
Control 9		2 IFNA10 clones 1 IFNA5 clone 1 IFNA2 clone 1 IFNA7 clone 1 IFNA8 clone 1 IFNA4 clone
RNA-VHC (+) 1 HCV	6 IFNA5 clones 2 IFNA21 clones 1 IFNA17 clone	7 IFNA5 clones 1 IFNA21 clone 1 IFNA7 clone
RNA-VHC (+) 2 HCV	2 IFNA5 clones 4 IFNA21 clones	5 IFNA5 clones 4 IFNA21 clones
RNA-VHC (+) 3 HCV	5 IFNA5 clones 2 IFNA21 clones 2 IFNA1 clones	

Description of the figures

Figure 1: Expression of alpha interferon/ β -actin ^{mRNA}~~RNA~~ (ordinate) in peripheral blood mononuclear cells (A) and in the liver (B) of healthy controls and patients with chronic hepatitis C (HCV-RNA+) (abscissa).

5 **Figure 2:** Expression of beta interferon/ β -actin ^{mRNA}~~RNA~~ (ordinate) in peripheral blood mononuclear cells (A) and in the liver (B) of healthy controls (C) and patients with chronic hepatitis C (HCV-RNA+) (abscissa).

Figure 3: Relationship between the initial quantity of total RNA (abscissa) and the strength of the PCR product band obtained by amplifying the ^{mRNA}~~RNA~~ of IFN α (●), IFN β (▲) and β -
10 actin (◆) (ordinate, as counts \times mm²) in PBMC (A) and liver (B) samples.

PATENT COOPERATION TREATY

ELZABURU	U013039-2
02.05	168529
PCT ACH	

From the:
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To:
ELZABURU S.A.
Miguel Angel, 21
28010 Madrid
ESPAGNE

WRITTEN OPINION

(PCT Rule 66)

Date of mailing (day/month/year)		3 1. 05. 00	
Applicant's or agent's file reference PCT-51		REPLY DUE within 2 month(s) from the above date of mailing	
International application No. PCT/ES99/00134	International filing date (day/month/year) 13/05/1999	Priority date (day/month/year) 13/05/1998	
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC A61K38/21			
Applicant INSTITUTO CIENTIFICO Y TECNOLOGICO DE... et al.			

1. This written opinion is the **second** drawn up by this International Preliminary Examining Authority.
2. This opinion contains indications relating to the following items:

I	<input checked="" type="checkbox"/>	Basis of the opinion
II	<input type="checkbox"/>	Priority
III	<input type="checkbox"/>	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
IV	<input type="checkbox"/>	Lack of unity of invention
V	<input checked="" type="checkbox"/>	Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
VI	<input type="checkbox"/>	Certain document cited
VII	<input checked="" type="checkbox"/>	Certain defects in the international application
VIII	<input checked="" type="checkbox"/>	Certain observations on the international application
3. The applicant is hereby **invited to reply** to this opinion.

When? See the time limit indicated above. The applicant may, before the expiration of that time limit, request this Authority to grant an extension, see Rule 66.2(d).

How? By submitting a written reply, accompanied, where appropriate, by amendments, according to Rule 66.3. For the form and the language of the amendments, see Rules 66.8 and 66.9.

Also: For an additional opportunity to submit amendments, see Rule 66.4.
 For the examiner's obligation to consider amendments and/or arguments, see Rule 66.4 bis.
 For an informal communication with the examiner, see Rule 66.6.

If no reply is filed, the international preliminary examination report will be established on the basis of this opinion.
4. The final date by which the international preliminary examination report must be established according to Rule 69.2 is: **13/09/2000.**

Name and mailing address of the international preliminary examining authority: European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized officer / Examiner Winger, R Formalities officer (incl. extension of time limits) Senkel, H Telephone No. +49 89 2399 8071
---	---



9. Former claim 10 has been redrafted as new claim 9 emphasising that the somatic gene therapy composition is based in DNA material coding for IFN-alpha 5. Further ingredients are any suitable and well known in pharmacy and health care and they are obviously not claimed.

All the amendments made are based on the former claims as filed and they only involve a rewording to improve clarity.

Re Section V

3. Inventive step


The closest prior art is D1 wherein a comparative anti-tumour effect of different interferon-alpha subtypes, including IFN-alpha 5, is shown. The objective problem solved by the invention is that IFN-alpha 5 levels are reduced in liver tissue of patients suffering for chronic hepatitis C of viral origin. By supplying these patients with pharmaceutical compositions comprising IFN-alpha 5 itself or somatic gene therapy compositions comprising IFN-alpha 5 coding isolated DNA sequences, recover would be achieved. However, D1 emphasises the potent anti-viral effect of IFN-alpha 8 (page 1032, 3rd paragraph, 1st column) without saying too much about IFN-alpha 5. Moreover, D1 (page 1032, 2nd paragraph, 2nd column) mentions the hypothesis that the existence of a multiplicity of IFN subtypes is due to the fact that different tissues may respond preferentially to a particular subtype. However, the results disclosed in D1 do not support that hypothesis, because the relative anti-viral properties of the different subtypes were broadly similar. D2 did not teach much on that direction. As a matter of fact, D2 uses a recombinant IFN-alpha (IFN-apha-2b) for treatment of chronic hepatitis C. It cannot be considered, consequently, as obvious to a skill man, departing from D1's teaching about the unespecific anti-viral effect of IFN-alpha subtypes particularly regarding its tissular origin, to come to the conclusion achieved in the invention by reading D2 which discloses the use of a recombinant IFN-alpha not linked therefor, to any specific tissue. Consequently, in our opinion, the international application does involve inventive step cause it is not derived from the prior art in an obvious manner to a skill person.

In any case, we respectfully request according to Rule 66.4 PCT and taking into account the deadline of 13.09.00 to have the

preliminary report established according to Rule 69.2, an
additional opportunity to submit amendments.

Yours faithfully,

E L Z A B U R U



Argimiro Cadenas

Alberto de Elzaburu
† Fernando de Elzaburu
Alfonso D Rivera Elzaburu
Carlos Morán
Miguel A Baz
Enrique Armijo
Germán Burgos
Luis H de Larramendi
Doris Bandin
Roberto Martínez
Antonio Tavira
Antonio Castán
Ignacio D Rivera Elzaburu

Argimiro Cadenas
José María Alvarez
Javier Cervera
Begoña Larrondo
Heinrich Möhring
Juan A Rubiano
Jesús G Montero
José Manuel Cruz
Pablo González-Bueno
Luis Beneyto
Xavier Lamiquiz
José I San Martín

Miguel A Medina
Manuel Illescas
Luis Baz
Ramón Cañizares
Victor Carbayo
E Armijo Chávarri
Concepción Chacón
Ana Donate

I Arocas
A Vila
B de Haro
C Bonzom
M P Martínez
AFD Rivera Elzaburu
J J Caselles
F Ilardia
I Andrade
R Torrecillas
L Moraleda
L Alonso
C Aguilera
J Ubeda-Romero
A Pérez
P Satorio
L Soriano
SD Rivera Elzaburu

Continuadores de
Julio de Vizcarrondo 1865-1889
F de Elzaburu Vizcarrondo
1880-1921
Alberto de Elzaburu F 1920-1974
Oscar de Elzaburu F 1924-1985
Oficina Vizcarelza Sres Elzaburu

Agentes Prop Industrial
y de Patentes Europeas
European Patent Attorneys
Agentes Europeos de Marcas
ante la OAMI/OHIM (Alicante)
European Trademark Attorneys

Abogados Ingenieros
Químicos Biólogos

Traductores de
Patentes Europeas
Intérpretes Jurados

Telegramas VIZCARELZA
Teléfono (34) 91 700 9400
Telefax (34) 91 319 3810
Videocnf (34) 91 702 0786
www.elzaburu.es
Correo Electrónico - E-Mail
elzaburu@elzaburu.es

European Patent Office
München
Alemania

Attn. R. Winger
Formalities Officer

S/Your ref

N/Our ref
MIT/JL/PCT-51

✉ Miguel Angel, 21
28010 Madrid 10 April 2000

BY COURIER

Re: PCT Application No. ES99/00134
Applicant: INSTITUTO CIENTIFICO Y TECNOLOGICO ... et al.

Ladies & Gentlemen,

We reply to the first written opinion drawn up by that IPEA, by enclosing herewith pages 6, 8, 12-16 of the Specification (English translation) amended in order to correct the defects detected and to overcome the observations made in your brief.

Re Section VII

4. We believe that all clerical errors (VHC, RNAm) has been duly corrected.

Re Section VIII

5. The term "essentially derived gene sequences" has been deleted.

Items 6-9 have been dealt with by amending the claims as enclosed herewith.

7. Former claim 5 has been deleted.

8. Former claims 6-8, now new claims 5-7 have been rewording to better put them into the scope of claim 1.

SECOND AMENDED SET OF CLAIMS

1. Use of IFN-alpha 5 or the gen sequence coding for IFN-alpha 5 in the production of compositions useful for treatment of liver diseases.
2. Use according to claim 1 wherein those compositions are useful against chronic hepatitis C.
3. Use according to claim 1 wherein those compositions are useful against cirrhosis of viral origin.
4. Use according to claim 1 wherein those compositions are useful against hepatocellular carcinoma.
5. Use according to anyone of claims 1-4 in which the composition comprises an IFN-alpha 5 recombinant protein obtained by cloning in a suitable host an expression vector comprising the gen sequence coding for IFN-alpha 5.
6. Use according to claim 5 wherein in which the cloned host is a eucaryote organism, preferably *Escherichia coli*.
- 7. Use according to claim 5, in which the cloned host is a procaryote organism, preferably *Solanum tuberosum*.
8. Use according to claims 1-7 in which the composition can be included in any foodstuff.
9. Use according to claims 1-4, characterised by those compositions comprising the gen sequence coding for IFN-alpha 5 and being applied by somatic gene therapy.

The serum samples were obtained by centrifuging from venous blood collected in sterile tubes. The serum was kept at -40°C until use.

Analysis of the expression of IFN α and IFN β genes in the liver and PBMC

RNA levels of IFN α and IFN β were determined using a quantitative polymerase chain reaction reverse transcription (RT-PCR) method using a thermocycler (Perkin-Elmer Gene Amp PCR system 2400). Prior to reverse transcription 2 μg of total RNA (from both the liver and PBMC) were treated with 1 unit of deoxyribonuclease (DNase I amplification grade, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) to eliminate possible contaminating DNA. The presence of traces of DNA was checked by including control reactions without reverse transcription. This step is required because of the absence of introns in IFN α and IFN β genes (18), which made it impossible for us to distinguish the product of PCR from the RNA or possible contaminating DNA. All the controls performed without reverse transcription were negative, indicating the absence of contaminating DNA. Total RNA was transcribed (60 minutes at 37°C) with 400 units of M-MuLV reverse transcriptase (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) in a final volume of 40 μl of $5 \times$ saline solution (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl_2), supplemented with 5 mM DTT, 0.5 mM triphosphate deoxyribonucleotides (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), 48 units of RNAsas inhibitor (Promega Corporation, MD, US) and 400 ng of random hexamers (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). After denaturing the reverse transcriptase (95°C , 1 minute) and rapidly cooling over ice, a 10 μl aliquot (0.5 μg) of the cDNA was used to amplify the IFN α and IFN β by PCR in 50 μl of $10 \times$ PCR buffer (160 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 670 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1% Tween 20) supplemented with the direction and antidirection primers (40 ng of each one for IFN α and 60 ng for IFN β), 1.2 mM MgCl_2 and 2 units of BiotaqTM DNA polymerase (Bioline, London, UK). Control reactions without RNA were performed in all the experiments. As an internal control for each sample a fragment of β -actin cDNA was amplified using a 10 μl aliquot of the cDNA obtained previously. The IFN α was amplified by performing 30 or 33 cycles (PBMC or liver respectively) (94°C , 60°C and 72°C during 20, 15 and 30 seconds for each step respectively), the IFN β was amplified by performing 30 or 35 cycles (PBMC or liver respectively) (94°C , 58°C and 72°C for 20, 15 and 30 seconds for each step respectively).

Response to 2nd preliminary opinion

Ladies & Gentlemen,

We reply to the 2nd written opinion drawn up by that IPEA by enclosing new amended pages of the specification and claims (English translation) prepared to overcome the observations raised in your brief. Also arguments are supplied hereto to support the patentability of our client's invention.

Re Section I

The gen sequence (DNA) coding for IFN-alpha5 represented as SEQ ID NO:1 is disclosed in the specification as filed. By restricting "any isolated DNA sequence..." to "the gen sequence.....", we believe there would be support enough in the description as formerly filed. The new amended set of claims is restricted in the way previously explained. In pages 13-15 of the international application (Spanish version), cloning of the cDNA into E. coli to obtain IFN-alpha5 recombinant protein is disclosed. The same applies in pages 15-16 for expression in Solanum tuberosum.

Thus we believe the amendments made in this response fulfilled Art. 34(2)(b) PCT, because new amended claims drafted are even more precise on that respect.

RE Section V

Problem solution approach has been reformulated according to the examiner's suggestion. The technical problem to be solved is the use of IFN-alpha5 against viral liver diseases, particularly HCV. D1 taken as the closest prior art shows the anti-viral activity of several I subtypes of IFN but against EMC virus (Antiviral assays on page 1028 using an encephalomyelitis murine virus). Moreover, the cells used in the assay were liver tumor cells. That document shows that IFN-alpha 8 has the most potent antiviral activity. Nothing is said about the activity of IFN-alpha5 against HCV, particularly having in mind the discovery of its diminished levels in liver of patients suffering for chronic hepatitis C of viral origin. Moreover, in page 1032, criticism is expressed in the sense that a IFN subtype is not specifically linked to a particular tissue from a point of view of its sensitivity against viral infections. We recall that IFN-alpha5 is the only IFN-alpha expressed in liver tissue from healthy patients. Differences between the virus used in the assays, and even their origins (human for HCV and murine for EMC) make little feasible to arrive to the technical solution disclosed in the invention by combining D1 with any other document. Particularly with D2 which discloses the use of a recombinant IFN-alpha2b in

patients suffering from hepatitis C. But, again, nothing is said about IFN-alpha5. As matter of fact, combination of D1+D2 will not lead to a skill man to the solution proposed in the invention because, in the discussion on page 1031 of D1, recombinant IFN-alpha protein subtypes are criticised.

Re Section VII

New page 7 (English translation) is enclosed herewith with outstanding clerical errors handwritten amended.

Re Section VIII

New amended claims, we believe, are fully supported by the description as far as there are reasonable perspectives that a composition based on IFN-alpha5, which is the only IFN subtype expressed in healthy human livers and whose levels are decreased in livers of HCV patients, must be active against chronic hepatitis C of viral origin. Other elements that may form part of the composition (excipients, inert vehicles, solutions, disolvents, emulsions, etc) are all well known in the art and therefor, they are not claimed as such.

We hope that the above arguments and the attached enclosures may overcome the objections raised in the preliminary opinion. Notwithstanding the previous statement, we will be available for a phone conversation or a video conference with the examiner in charge of this application to further comment or to clarify any outstanding question that might have remain yet unsolved, before the IPER will be issued.

Yours faithfully

E L Z A B U R U

Dr. Manuel Illescas

Enclosures: - New set of amended claims in English.
- Page 7 of the English translation
amended in line 17.

The demand must be filed directly with the competent International Preliminary Examining Authority, or, if two or more Authorities are competent, with the one chosen by the applicant. Full name or two-letter code of that Authority may be indicated by the applicant on the line below:

IPEA/ European Patent Office

PCT

CHAPTER II

DEMAND

under Article 31 of the Patent Cooperation Treaty:

The undersigned requests that the international application specified below be the subject of international preliminary examination according to the Patent Cooperation Treaty and hereby elects all eligible States (except where otherwise indicated).

For International Preliminary Examining Authority use only	
Identification of IPEA	Date of receipt of DEMAND
Box No. I IDENTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION	
Applicant's or agent's file reference PCT-51	
International application No. PCT/ES99/00134	International filing date (day/month/year) 13 May 1999
(Earliest) Priority date (day/month/year) 13 May 1998	
Title of invention "USE OF INTERFERON ALPHA 5 IN THE TREATMENT OF VIRAL LIVER DISEASES"	
Box No. II APPLICANT(S)	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)	
INSTITUTO CIENTIFICO Y TECNOLOGICO DE NAVARRA, S.A.	
Avda. Pío XII, 53	
31008 Pamplona - Navarra	
Spain	
Telephone No.:	
Facsimile No.:	
Teleprinter No.:	
State (that is, country) of nationality: SPAIN	State (that is, country) of residence: SPAIN
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)	
PRIETO VALTUEÑA, JESUS	
C/ Tudela, 22 - 4º	
Pamplona - Navarra	
Spain	
State (that is, country) of nationality: SPAIN	State (that is, country) of residence: SPAIN
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)	
CIVEIRA MURILLO, M^a PILAR	
C/ Irunlarrea, 35 - 1º	
Pamplona - Navarra	
Spain	
State (that is, country) of nationality: SPAIN	State (that is, country) of residence: SPAIN
<input checked="" type="checkbox"/> Further applicants are indicated on a continuation sheet.	

Continuation of Box No. II APPLICANT(S)

If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the demand.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

LARREA LEOZ, ESTHER
Avda. Sancho el Fuerte, 34 - 3º C
Pamplona - Navarra
Spain

State (that is, country) of nationality:

SPAIN

State (that is, country) of residence:

SPAIN

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)

State (that is, country) of nationality:

State (that is, country) of residence:

☐ Further applicants are indicated on another continuation sheet.

Box No. III AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The following person is ☒ agent ☐ common representative

and ☒ has been appointed earlier and represents the applicant(s) also for international preliminary examination.

☐ is hereby appointed and any earlier appointment of (an) agent(s)/common representative is hereby revoked.

☐ is hereby appointed, specifically for the procedure before the International Preliminary Examining Authority, in addition to the agent(s)/common representative appointed earlier.

Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation.
The address must include postal code and name of country.)

ELZABURU MARQUEZ, ALBERTO
Miguel Angel, 21
28010 - Madrid
Spain

Telephone No.:

91 700.94.00

Facsimile No.:

91 319.38.10

Teleprinter No.:

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.

Box No. IV BASIS FOR INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION
Statement concerning amendments:*

1. The applicant wishes the international preliminary examination to start on the basis of:

☒ the international application as originally filed

the description ☐ as originally filed

☐ as amended under Article 34

the claims ☐ as originally filed

☐ as amended under Article 19 (together with any accompanying statement)

☐ as amended under Article 34

the drawings ☐ as originally filed

☐ as amended under Article 34

2. ☐ The applicant wishes any amendment to the claims under Article 19 to be considered as reversed.

3. ☐ The applicant wishes the start of the international preliminary examination to be postponed until the expiration of 20 months from the priority date unless the International Preliminary Examining Authority receives a copy of any amendments made under Article 19 or a notice from the applicant that he does not wish to make such amendments (Rule 69.1(d)). (This check-box may be marked only where the time limit under Article 19 has not yet expired.)

* Where no check-box is marked, international preliminary examination will start on the basis of the international application as originally filed or, where a copy of amendments to the claims under Article 19 and/or amendments of the international application under Article 34 are received by the International Preliminary Examining Authority before it has begun to draw up a written opinion or the international preliminary examination report, as so amended.

Language for the purposes of international preliminary examination: English
☐ which is the language in which the international application was filed.

☐ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search.

☐ which is the language of publication of the international application.

☒ which is the language of the translation (to be) furnished for the purposes of international preliminary examination.

Box No. V ELECTION OF STATES

The applicant hereby elects all eligible States (that is, all States which have been designated and which are bound by Chapter II of the PCT)

excluding the following States which the applicant wishes not to elect:

B x N . VI CHECK LIST

The demand is accompanied by the following elements, in the language referred to in Box No. IV, for the purposes of international preliminary examination:

- | | | | |
|--|---|----|--------|
| 1. translation of international application | : | 22 | sheets |
| 2. amendments under Article 34 | : | | sheets |
| 3. copy (or, where required, translation) of amendments under Article 19 | : | | sheets |
| 4. copy (or, where required, translation) of statement under Article 19 | : | | sheets |
| 5. letter | : | 1 | sheets |
| 6. other (specify) declaration statement on sequence listing | : | 1 | sheets |

For International Preliminary Examining Authority use only

received not received

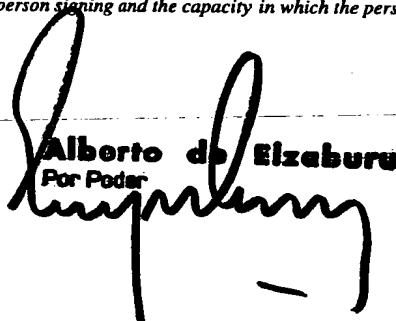
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

The demand is also accompanied by the item(s) marked below:

- | | |
|--|--|
| 1. <input checked="" type="checkbox"/> fee calculation sheet | 4. <input type="checkbox"/> statement explaining lack of signature |
| 2. <input type="checkbox"/> separate signed power of attorney | 5. <input checked="" type="checkbox"/> nucleotide and or amino acid sequence listing in computer readable form |
| 3. <input type="checkbox"/> copy of general power of attorney; reference number, if any: | 6. <input checked="" type="checkbox"/> other (specify): Additional representatives |

Box No. VII SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE

Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the demand).


Alberto de Elzaburu
For Peder

For International Preliminary Examining Authority use only

1. Date of actual receipt of DEMAND:

2. Adjusted date of receipt of demand due to CORRECTIONS under Rule 60.1(b):

3. ☐ The date of receipt of the demand is AFTER the expiration of 19 months from the priority date and item 4 or 5, below, does not apply.

☐ The applicant has been informed accordingly.

4. ☐ The date of receipt of the demand is WITHIN the period of 19 months from the priority date as extended by virtue of Rule 80.5.

5. ☐ Although the date of receipt of the demand is after the expiration of 19 months from the priority date, the delay in arrival is EXCUSED pursuant to Rule 82.

For International Bureau use only

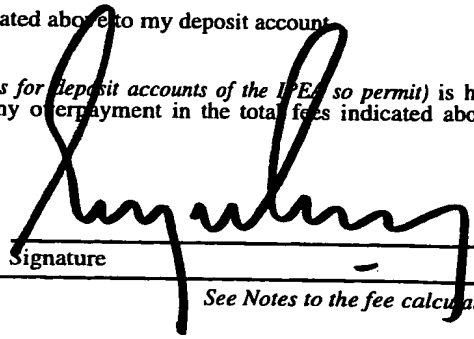
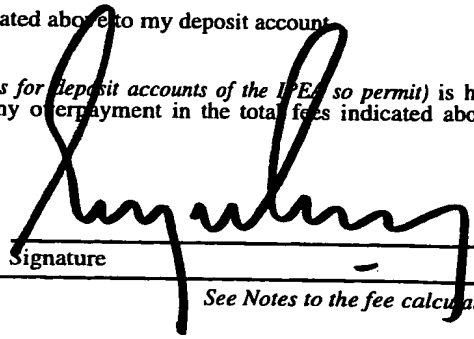
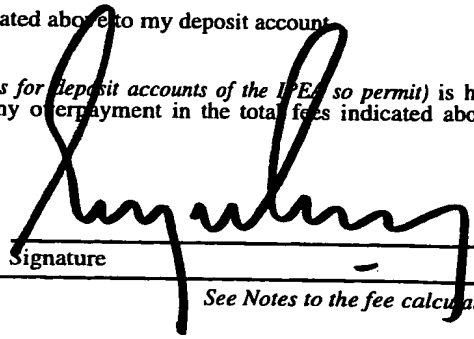
Demand received from IPEA on:

PCT

CHAPTER II

FEE CALCULATION SHEET

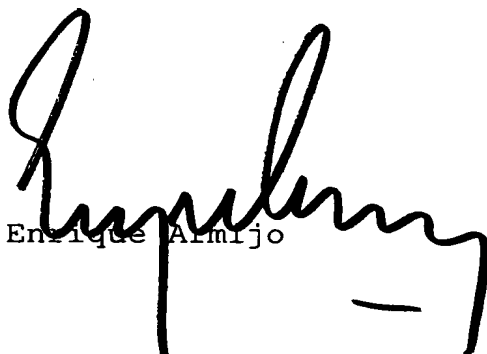
Annex to the Demand for international preliminary examination

<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">International application No.</td> <td style="width: 50%;">PCT/ES99/00134</td> </tr> <tr> <td>Applicant's or agent's file reference</td> <td>PCT-51</td> </tr> </table>	International application No.	PCT/ES99/00134	Applicant's or agent's file reference	PCT-51	<p>For International Preliminary Examining Authority use only</p> <p>Date stamp of the IPEA</p>								
International application No.	PCT/ES99/00134												
Applicant's or agent's file reference	PCT-51												
<p>Applicant</p> <p>INSTITUTO CIENTIFICO Y TECNOLOGICO DE NAVARRA S.A.</p>													
<p>Calculation of prescribed fees</p> <table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 60%;">1. Preliminary examination fee</td> <td style="width: 20%; text-align: center;">EUR 1.533</td> <td style="width: 20%; text-align: center;">P</td> </tr> <tr> <td>2. Handling fee (<i>Applicants from certain States are entitled to a reduction of 75% of the handling fee. Where the applicant is (or all applicants are) so entitled, the amount to be entered at H is 25% of the handling fee.</i>)</td> <td style="text-align: center;">EUR 148</td> <td style="text-align: center;">H</td> </tr> <tr> <td>3. Total of prescribed fees Add the amounts entered at P and H and enter total in the TOTAL box</td> <td style="text-align: center;">EUR 1.681</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td style="text-align: center;">TOTAL</td> <td></td> </tr> </table>		1. Preliminary examination fee	EUR 1.533	P	2. Handling fee (<i>Applicants from certain States are entitled to a reduction of 75% of the handling fee. Where the applicant is (or all applicants are) so entitled, the amount to be entered at H is 25% of the handling fee.</i>)	EUR 148	H	3. Total of prescribed fees Add the amounts entered at P and H and enter total in the TOTAL box	EUR 1.681			TOTAL	
1. Preliminary examination fee	EUR 1.533	P											
2. Handling fee (<i>Applicants from certain States are entitled to a reduction of 75% of the handling fee. Where the applicant is (or all applicants are) so entitled, the amount to be entered at H is 25% of the handling fee.</i>)	EUR 148	H											
3. Total of prescribed fees Add the amounts entered at P and H and enter total in the TOTAL box	EUR 1.681												
	TOTAL												
<p>Mode of Payment</p> <table style="width: 100%;"> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/> authorization to charge deposit account with the IPEA (see below)</td> <td><input type="checkbox"/> cash</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> cheque</td> <td><input type="checkbox"/> revenue stamps</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> postal money order</td> <td><input type="checkbox"/> coupons</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> bank draft</td> <td><input type="checkbox"/> other (specify):</td> </tr> </table>		<input checked="" type="checkbox"/> authorization to charge deposit account with the IPEA (see below)	<input type="checkbox"/> cash	<input type="checkbox"/> cheque	<input type="checkbox"/> revenue stamps	<input type="checkbox"/> postal money order	<input type="checkbox"/> coupons	<input type="checkbox"/> bank draft	<input type="checkbox"/> other (specify):				
<input checked="" type="checkbox"/> authorization to charge deposit account with the IPEA (see below)	<input type="checkbox"/> cash												
<input type="checkbox"/> cheque	<input type="checkbox"/> revenue stamps												
<input type="checkbox"/> postal money order	<input type="checkbox"/> coupons												
<input type="checkbox"/> bank draft	<input type="checkbox"/> other (specify):												
<p>Deposit Account Authorization (<i>this mode of payment may not be available at all IPEAs</i>)</p> <p>The IPEA/ <u>EPO</u> <input checked="" type="checkbox"/> is hereby authorized to charge the total fees indicated above to my deposit account.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> (<i>this check-box may be marked only if the conditions for deposit accounts of the IPEAs so permit</i>) is hereby authorized to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above to my deposit account.</p> <table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 30%;"><u>28120008</u></td> <td style="width: 30%;"><u>17 November 1999</u></td> <td style="width: 40%;"></td> </tr> <tr> <td>Deposit Account Number</td> <td>Date (day/month/year)</td> <td>Signature</td> </tr> </table>		<u>28120008</u>	<u>17 November 1999</u>		Deposit Account Number	Date (day/month/year)	Signature						
<u>28120008</u>	<u>17 November 1999</u>												
Deposit Account Number	Date (day/month/year)	Signature											

ADDITIONAL REPRESENTATIVE(S)

ADDITIONAL SHEET PERTAINING TO INTERNATIONAL
PATENT APPLICATION IN THE NAME OF INSTITUTO
CIENTIFICO Y TECNOLOGICO DE NAVARRA, S.A.,
CORRESPONDING TO INTERNATIONAL PATENT APPLI-
CATION N° PCT/ES99/00134 OF 13 MAY 1999.

ADDITIONAL REPRESENTATIVES



Enrique Almijo



José M. Alvarez

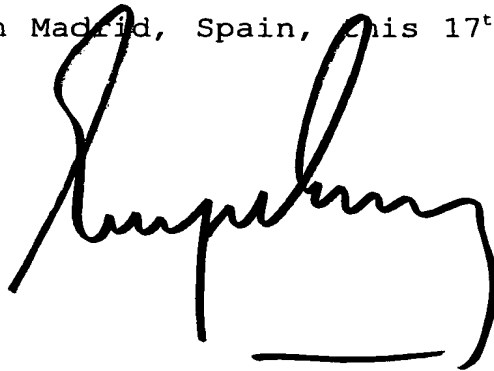
ALL WITH PROFESSIONAL PRACTICE AT MIGUEL ANGEL
N° 21, MADRID, SPAIN

Mr. Enrique Armijo, Proxy of Mr. Alberto de Elzaburu, as representative of Instituto Científico y Tecnológico de Navarra, S.A. in the prosecution of PCT application for "USE OF INTERFERON ALPHA 5 IN THE TREATMENT OF VIRAL LIVER DISEASES",

DECLARES

that, in virtue of Art. 13 ter of the PCT Rules, the sequence listing attached herewith in computer readable system, does not include which goes beyond the disclosure in the international application as filed.

I sign the present declaration in Madrid, Spain, this 17th day of November 1999.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Enrique Armijo', is written over the signature line. The signature is fluid and cursive, with a long horizontal stroke at the end.

PETITORIO PCT

PCT-51

Original (para PRESENTACION) - imprimido el 11.05.1999 01:21:40 PM

0	Para uso de la Oficina receptora únicamente	
0-1	Solicitud internacional No..	
0-2	Fecha de presentación internacional	
0-3	Nombre de la Oficina receptora y "Solicitud Internacional PCT"	
0-4	Formulario - PCT/RO/101 Petitorio PCT	
0-4-1	Preparado usando	PCT-EASY Version 2.84 (actualizado el 01.04.1999)
0-5	Petición El abajofirmante solicita que la presente solicitud internacional sea procesada de acuerdo con el Tratado de Cooperación en materia de Patentes	
0-6	Oficina receptora (indicada por el solicitante)	Oficina Española de Patentes y Marcas (RO/ES)
0-7	Referencia al expediente del solicitante o del mandatario	PCT-51
I	Título de la invención	USO DEL INTERFERON ALFA-5 EN EL TRATAMIENTO DE LAS HEPATOPATIAS VIRALES
II	Solicitante	
II-1	Esta persona es:	solicitante únicamente
II-2	Solicitante para	todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América
II-4	Nombre	INSTITUTO CIENTIFICO Y TECNOLOGICO DE NAVARRA, S.A.
II-5	Dirección:	Avenida Pío XII, 53 31008 Pamplona, Navarra Spain
II-6	Estado de nacionalidad	ES
II-7	Estado de domicilio	ES
III-1	Solicitante e/o inventor	
III-1-1	Esta persona es:	solicitante e inventor
III-1-2	Solicitante para	Estados Unidos de América únicamente
III-1-4	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	PRIETO VALTUEÑA, Jesús
III-1-5	Dirección:	Tudela, 22 - 4° Pamplona, Navarra Spain
III-1-6	Estado de nacionalidad	ES
III-1-7	Estado de domicilio	ES

PETITORIO PCT

PCT-51

Original (para PRESENTACION) - imprimido el 11.05.1999 01:21:40 PM

III-2	Solicitante e/ invent r	
III-2-1	Esta persona es:	solicitante e inventor
III-2-2	Solicitante para	Estados Unidos de América únicamente
III-2-4	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	CIVEIRA MURILLO, M^a Pilar
III-2-5	Dirección:	Irunlarrea, 35 - 1^o Pamplona, Navarra Spain
III-2-6	Estado de nacionalidad	ES
III-2-7	Estado de domicilio	ES
III-3	Solicitante e/o inventor	
III-3-1	Esta persona es:	solicitante e inventor
III-3-2	Solicitante para	Estados Unidos de América únicamente
III-3-4	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	LARREA LEOZ, Esther
III-3-5	Dirección:	Avenida Sancho el Fuerte, 34 - 3^o C Pamplona, Navarra Spain
III-3-6	Estado de nacionalidad	ES
III-3-7	Estado de domicilio	ES
IV-1	Mandatario o representante común; o dirección para la correspondencia La persona identificada a continuación se designa/ha sido designada para actuar en nombre del/de los solicitante(s) ante las administraciones internacionales competentes como:	mandatario
IV-1-1	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	ELZABURU, Alberto de
IV-1-2	Dirección:	Miguel Angel, 21 28010 Madrid Spain
IV-1-3	No. de teléfono	34 91 7009400
IV-1-4	No. de telefaxímile	34 91 3193810
IV-1-5	Correo electrónico	elzaburu@elzaburu.es
V	Designación de Estados	
V-1	Patente regional (otros tipos de protección o de tramitación, si es posible hacerlo, están indicados entre paréntesis a continuación de la(s) designación(es) correspondiente(s))	AP: GH GM KE LS MW SD SZ UG ZW y cualquier otro Estado contractante del Protocolo de Harare y del PCT EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM y cualquier otro Estado contractante del Convenio sobre la Patente Euroasiática y del PCT EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE y cualquier otro Estado contractante del Convenio sobre la Patente Europea y del PCT OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GW ML MR NE SN TD TG y cualquier otro Estado que sea Estado miembro de la OAPI y que sea un Estado contractante del PCT

PETITORIO PCT

PCT-51

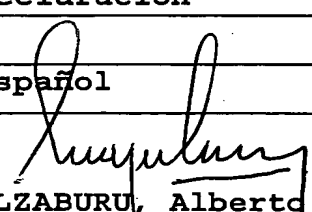
Original (para PRESENTACION) - imprímido el 11.05.1999 01:21:40 PM

V-2	Patente nacional (otros tipos de protección o de tramitación, si es posible hacerlo, están indicados entre paréntesis a continuación de la(s) designación(es) correspondiente(s))	AE AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY CA CH&LI CN CU CZ DE DK EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MD MG MK MN MW MX NO NZ PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TR TT UA UG US UZ VN YU ZA ZW	
V-5	Declaración de designación precautoria Además de las designaciones efectuadas en los puntos V-1, V-2 y V-3, el solicitante efectuará también, en virtud de la Regla 4.9.b), todas las designaciones que estén permitidas con arreglo al PCT, salvo la(s) designación(es) del(de los) Estado(s) indicado(s) en el punto V-6 a continuación. El solicitante declara que esas designaciones adicionales están sujetas a confirmación y que cualquier designación que no se confirme antes de que expiren los 15 meses a partir de la fecha prioritaria se considerará retirada por el solicitante al expirar dicho plazo.		
V-6	Exclusión de las designaciones precautorias	NINGUNA	
VI-1	Reivindicación de prioridad de una solicitud nacional anterior		
VI-1-1	Fecha de presentación	13 Mayo 1998 (13.05.1998)	
VI-1-2	Número	9801003	
VI-1-3	País	ES	
VI-2	Petición de documento de prioridad Se ruega a la Oficina receptora que prepare y transmita a la Oficina Internacional una copia certificada de la(s) solicitud(es) anterior(es) identificada(s) supra como punto(s):	VI-1	
VII-1	Administración encargada de la búsqueda internacional elegida	Oficina Española de Patentes y Marcas (ISA/ES)	
VIII	Lista de verificación	número de hojas	fichero(s) electrónico(s) adjunto(s)
VIII-1	Petitorio	4	-
VIII-2	Descripción (excluida la parte correspondiente a la relación de secuencias)	22	-
VIII-3	Reivindicaciones	2	-
VIII-4	Resumen	1	resumenpct51.txt
VIII-5	Dibujos	3	-
VIII-6	Relación de secuencias, como parte de la descripción	1	-
VIII-7	TOTAL	33	

PETITORIO PCT

PCT-51

Original (para PRESENTACION) - imprime el 11.05.1999 01:21:40 PM

	Elementos de acompañamiento	documento(s) en papel adjunto(s)	fichero(s) electrónico(s) adjunto(s)
VIII-8	Hoja de cálculo de tasas	✓	-
VIII-9	Poder separado firmado	✓	-
VIII-15	Relación de una secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos en formato legible por ordenador		disquete separado
VIII-16	Disquete PCT-EASY	-	disquete
VIII-17	Otro (precisar):	Justificante pago de tasas	-
VIII-17	Otro (precisar):	Declaración	-
VIII-18	Figura de los dibujos que debe acompañar el resumen		
VIII-19	Idioma de presentación de la solicitud internacional	español	
IX-1	Firma del solicitante o del mandatario		
IX-1-1	Nombre (APELLIDOS, Nombre)	ELZABURU, Alberto de	P.P.

PARA USO DE LA OFICINA RECEPTORA UNICAMENTE

10-1	Fecha efectiva de recepción de la pretendida solicitud internacional	
10-2	Dibujos:	
10-2-1	Recibido	
10-2-2	No recibido	
10-3	Fecha efectiva de recepción, rectificada en razón de la recepción ulterior pero dentro del plazo, de documentos o de dibujos que completan la pretendida solicitud internacional	
10-4	Fecha de recepción, dentro del plazo, de las correcciones solicitadas según el Artículo 11(2) del PCT	
10-5	Administración encargada de la búsqueda internacional	ISA/ES
10-6	Transmisión de la copia para la búsqueda diferida hasta que se pague la tasa de búsqueda	

PARA USO DE LA OFICINA INTERNACIONAL UNICAMENTE

11-1	Fecha de recepción del ejemplar original por la Oficina Internacional	
------	---	--

PCT (ANEXO - HOJA DE CALCULO DE TASAS)

PCT-51

Duplicado del original imprimido en 13.05.1999 01:21:40 PM

(Esta hoja no forma parte de la solicitud internacional y no cuenta como una de sus hojas)

0	Para uso de la Oficina receptora únicamente		
0-1	Solicitud internacional No..		
0-2	Sello con la fecha de la Oficina receptora		
0-4	Formulario - PCT/RO/101 (Anexo)		
0-4-1	Hoja de cálculo de tasas PCT Preparado usando	PCT-EASY Version 2.84 (actualizado el 01.04.1999)	
0-9	Referencia al expediente del solicitante o del mandatario		PCT-51
2	Solicitante		INSTITUTO CIENTIFICO Y TECNOLOGICO DE NAVARRA, S.A., et al.
12	Calculo de las tasas prescritas	importe de la tasa/multiplicador	Importes totales (ESP)
12-1	Tasa de transmisión T	⇒	10.040
12-2	Tasa de búsqueda S	⇒	76.520
12-3	Tasa internacional Tasa de base (30 primeras hojas) b1	68.000	
12-4	Hojas restantes	3	
12-5	Cantidad adicional (X)	1.600	
12-6	Total de la cantidad adicional b2	4.800	
12-7	b1 + b2 = B	72.800	
12-8	Tasas de designación Número de designaciones contenidas en la solicitud internacional	79	
12-9	número de tasas de designación pagaderas (máximo 10)	10	
12-10	Importe de la tasa de designación (X)	16.000	
12-11	Total de las tasas de designación D	160.000	
12-12	Reducción de tasa PCT-EASY R	-20.900	
12-13	Total de la tasa internacional (B+D-R) I	⇒	211.900
12-14	Tasa por documento de prioridad Número de documentos de prioridad solicitados	1	
12-15	Tasa por documento (X)	4.015	
12-16	Total de la tasa por documento de prioridad P	⇒	4.015
12-17	TOTAL DE LAS TASAS PAGADERAS (T+S+I+P)	⇒	302.475
12-19	Modo de pago:	efectivo	

LISTA DE VALIDACIONES Y OBSERVACIONES

PCT (ANEXO - HOJA DE CALCULO DE TASAS)

PCT-51

Original (para PRESENTACION) - imprimido el 11.05.1999 01:21:40 PM

13-2-3	Mensajes de validación Nombres	Verde? Solicitante 1.: Falta el No. de teléfono
		Verde? Solicitante 1.: Falta el No. de telefacsímile
		Amarillo Solicitante 2.: Falta el código postal
		Verde? Solicitante 3.: Cuando se indiquen varios nombres de pila se aconseja separarlos mediante comas. Sírvase verificar.
		Amarillo Solicitante 3.: Falta el código postal
		Amarillo Solicitante 4.: Falta el código postal
		Verde? Mandatario 1.: Cuando se indiquen varios nombres de pila se aconseja separarlos mediante comas. Sírvase verificar.
13-2-6	Mensajes de validación Contenido	Verde? No se ha especificado la figura de los dibujos que debe acompañar el resumen. Sírvase verificar.

PCT
 ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL
 Oficina Internacional
 SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACION
 EN MATERIA DE PATENTES (PCT)



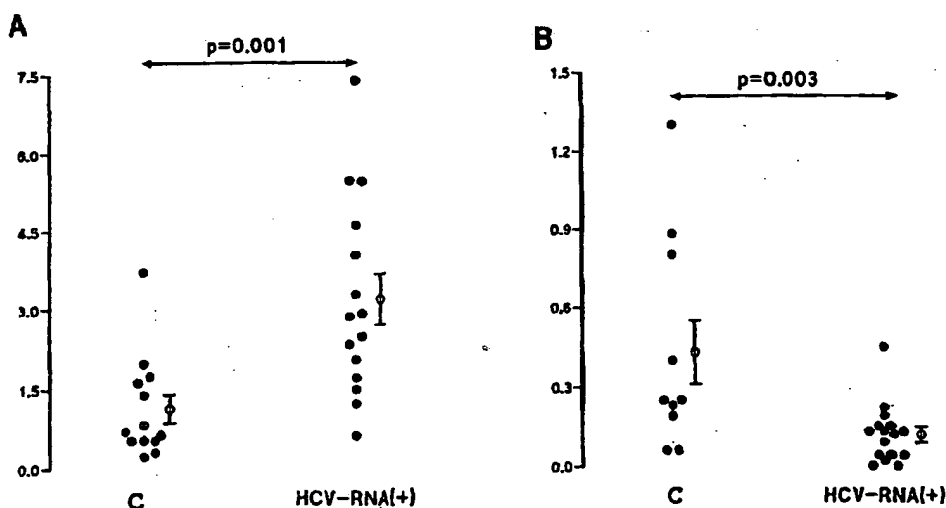
<p>(51) Clasificación Internacional de Patentes⁶ : A61K 38/21</p>	A1	<p>(11) Número de publicación internacional: WO 99/58143</p> <p>(43) Fecha de publicación internacional: 18 de Noviembre de 1999 (18.11.99)</p>
<p>(21) Solicitud internacional: PCT/ES99/00134</p> <p>(22) Fecha de la presentación internacional: 13 de Mayo de 1999 (13.05.99)</p> <p>(30) Datos relativos a la prioridad: P 9801003 13 de Mayo de 1998 (13.05.98) ES</p> <p>(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): INSTITUTO CIENTIFICO Y TECNOLOGICO DE NAVARRA, S.A. [ES/ES]; Avenida Pío XII, 53, E-31008 Pamplona (ES).</p> <p>(72) Inventores; e</p> <p>(75) Inventores/solicitantes (sólo US): PRIETO VALTUEÑA, Jesús [ES/ES]; Tudela, 22 - 4º, E-31002 Pamplona (ES). CIVEIRA MURILLO, Mª Pilar [ES/ES]; Irunlarrea, 35 - 1º, E-31008 Pamplona (ES). LARREA LEOZ, Esther [ES/ES]; Avenida Sancho el Fuerte, 34 - 3º C, E-31008 Pamplona (ES).</p> <p>(74) Mandatario: DE ELZABURU, Alberto; Miguel Angel, 21, E-28010 Madrid (ES).</p>		
<p>(81) Estados designados: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, Patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), Patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p style="text-align: center;">Publicada Con informe de búsqueda internacional.</p>		

(54) Title: UTILIZATION OF INTERFERON ALPHA 5 IN THE TREATMENT OF VIRAL HEPATOPATHIES

(54) Título: USO DEL INTERFERON ALFA 5 EN EL TRATAMIENTO DE LAS HEPATOPATIAS VIRALES

(57) Abstract

The invention relates to the use of the interferon alpha 5 in the treatment of viral hepatopathies. The invention describes the reduced synthesis of IFN α 5 in the livers of patients with hepatitis C in comparison to healthy livers. The sub-type of IFN expressed in said healthy livers corresponded only to the sub-type alpha 5 in comparison with the different sub-types expressed in ill livers. The sequence SEQ ID NO:1 shows the partial sequence of cDNA corresponding to IFN α 5. These significant differences between the expression patterns of some livers and others demonstrate the importance of the use of such interferon sub-type in the fabrication of compositions useful in the treatment of viral hepatopathies. The invention discloses in details such utilization in different forms and processes, including those which use the production of recombinant proteins from sequences of the type SEQ ID NO:1.



(57) Resumen

La invención describe la síntesis disminuida de IFN α 5 en hígados de pacientes con hepatitis C, frente a hígados de controles sanos. El subtipo de IFN expresado en dichos hígados sanos, correspondió únicamente al subtipo alfa 5, frente a los diferentes subtipos expresados en hígados enfermos. En SEQ ID NO:1 se muestra la secuencia parcial de cADN correspondiente a IFN α 5. Estas diferencias significativas entre los patrones de expresión de unos hígados y otros ponen de manifiesto la importancia del uso de este subtipo de interferon en la fabricación de composiciones útiles en el tratamiento de hepatopatías de origen viral. En la invención se describe pormenorizadamente esta utilización bajo diferentes formas y procedimientos, incluyendo aquellos que utilizan la producción de proteínas recombinantes, a partir de secuencias tipo SEQ ID NO:1.

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AL	Albania	ES	España	LS	Lesotho	SI	Eslovenia
AM	Armenia	FI	Finlandia	LT	Lituania	SK	Eslovaquia
AT	Austria	FR	Francia	LU	Luxemburgo	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabón	LV	Letonia	SZ	Swazilandia
AZ	Azerbaiyán	GB	Reino Unido	MC	Mónaco	TD	Chad
BA	Bosnia y Herzegovina	GE	Georgia	MD	República de Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tayikistán
BE	Bélgica	GN	Guinea	MK	Ex República Yugoslava de Macedonia	TM	Turkmenistán
BF	Burkina Faso	GR	Grecia	ML	Malí	TR	Turquía
BG	Bulgaria	HU	Hungría	MN	Mongolia	TT	Trinidad y Tabago
BJ	Benin	IE	Irlanda	MR	Mauritania	UA	Ucrania
BR	Brasil	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarús	IS	Islandia	MX	México	US	Estados Unidos de América
CA	Canadá	IT	Italia	NE	Níger	UZ	Uzbekistán
CF	República Centroafricana	JP	Japón	NL	Países Bajos	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Noruega	YU	Yugoslavia
CH	Suiza	KG	Kirguistán	PL	Nueva Zelandia	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	República Popular Democrática de Corea	PT	Portugal		
CM	Camerún	KR	República de Corea	RO	Rumania		
CN	China	KZ	Kazakstán	RU	Federación de Rusia		
CU	Cuba	LC	Santa Lucía	SD	Sudán		
CZ	República Checa	LI	Liechtenstein	SE	Suecia		
DE	Alemania	LK	Sri Lanka	SG	Singapur		
DK	Dinamarca	LR	Liberia				
EE	Estonia						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 99/00134

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPS:6 A61K 38/21

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC:6

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FOSTER, G.R. et al., "Different relative activities of human cell-derived interferon-alpha subtypes: IFN- α 8 has very high antiviral potency". JOURNAL OF INTERFERON AND CYTOKINE RESEARCH, 1996, Vol. 16, No. 12, pages 1027-1033	1,4,6,7,10
Y	the whole document	2,3
Y	DAVIS, G.L. et al., "Treatment of chronic hepatitis C with recombinant interferon alfa", THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, 1989, Vol. 321, No. 22, pages 1501-1506	2,3
	the whole document	

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
3 August 1999 (03.08.99)

Date of mailing of the international search report
13 August 1999 (03.08.99)

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O

Authorized officer

JOSÉ LUIS VIZÁN

Telephone No. + 34 91 3495524

Facsimile No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application N .

PCT/ ES99/00134

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SORIANO, V. Et al. "Interferon alpha for the treatment of chronic hepatitis C in patients infected with human immunodeficiency virus", CLINICAL INFECTIOUS DISEASES, 1996, Vol. 23, pages 585-591 the whole document	
A	MAUSS, S. Et al. "Response to treatment of chronic hepatitis C with interferon alpha in patients infected with HIV-1 is associated with higher CD4 + cell count", INFECTION, 1998, Vol. 26, No. 1, pages 16-19 the whole document	
A	SORIANO, V. Et al. "Efficacy and safety of alpha-interferon treatment for chronic hepatitis C in HIV - infected patients", JOURNAL OF INFECTION, 1995, Vol. 31, pages 9-13 the whole document	
A	DI BISCEGLIE, A. Et al. "Recombinant interferon alpha therapy for chronic hepatitis C". THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, 1989, Vol. 321, pages 1506-1510. the whole document	

- 1 -

USO DEL INTERFERON ALFA 5 EN EL TRATAMIENTO DE LAS HEPATOPATIAS VIRALES

Ambito de la invención

5

La invención se relaciona con la producción de interferon alfa 5 para su utilización en composiciones útiles en el tratamiento de las hepatopatías de origen viral.

Hemos comprobado que el IFN-alfa 5 es el único subtipo
10 de interferon alfa producido en el hígado sano y que sus niveles se encuentran claramente descendidos en la hepatitis crónica C lo que pone de manifiesto el valor terapéutico de esta sustancia en el tratamiento de esta enfermedad y de otras hepatitis víricas. Al conocerse la secuencia
15 génica codificante de este interferon, la producción del mismo por tecnología de ADN recombinante en diferentes huéspedes, permite el desarrollo de fármacos eficaces para el tratamiento de este tipo de hepatopatías, en sus diferentes fases de evolución.

20

Estado de la técnica anterior

Las células infectadas pueden reconocer la presencia de virus iniciando señales que llevan a la transcripción y
25 secreción de interferon tipo I (IFN α e IFN β). El IFN α es una familia de 13 polipéptidos (subtipos) codificados por diferentes genes. El IFN β es una glicoproteína producida por un único gen. Diversos tipos celulares producen tanto IFN α como IFN β (1,2).

30

La infección viral es el principal estímulo para la producción de interferon tipo I, aunque también existen otros factores que pueden aumentar su síntesis, como son

- 2 -

componentes bacterianos, RNA de doble cadena, factores de crecimiento y otras citoquinas (1). Además de la acción antiviral del IFN α , éste puede interactuar con ciertas citoquinas y con las células T regulando el crecimiento y diferenciación de las células del sistema inmune (3). Los genes del IFN α son expresados constitutivamente en tejidos humanos de individuos sanos (4), aunque la expresión de determinados subtipos está restringida a ciertos tipos celulares (5,6). La inducción de IFN por virus es regulada principalmente a nivel transcripcional. La activación transcripcional específica ocurre por la interacción de factores celulares inducidos por virus con los dominios reguladores de los promotores de los genes del IFN α . (7).

Todos los subtipos de IFN α e IFN β poseen un receptor común en la superficie de las células. Ensayos de competición de unión al receptor de diversos subtipos de IFN α indican que todos ellos se unen al mismo receptor, pero con diferente afinidad (8). La actividad biológica de los diferentes subtipos de IFN α es poco conocida. Los subtipos de interferon IFN α 5 e IFN α 8 parecen ser los que tienen mayor actividad antiviral. La respuesta antiproliferativa también es diferente entre los diversos subtipos (9). En humanos, las células mononucleares de sangre periférica no estimuladas expresan diversos subtipos de IFN α (10).

Un mecanismo común de persistencia de la infección viral es la evasión del sistema del IFN. Muchos virus han desarrollado estrategias para evitar los efectos antivirales del IFN. Concretamente, un defecto selectivo en la producción de IFN α ha sido descrito en monocitos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (11).

- 3 -

El virus de la hepatitis C (VHC) es un virus RNA de cadena sencilla que conlleva a una infección crónica en más de dos tercios de las personas infectadas. La prevalencia de infección por el VHC es alrededor del 2 al 3% en la población occidental. Estudios desarrollados en Europa muestran que el 33% de los pacientes con infección crónica por el VHC desarrollan cirrosis en un tiempo medio inferior a 20 años (12). Una proporción significativa de estos pacientes desarrollan cáncer hepático, con una incidencia anual del 1,4% (13). Ha sido difícil encontrar la razón del alto grado de persistencia de la infección por el VHC. La alta tasa de mutaciones del virus y la producción de un perfil predominante de citoquinas Th2 respecto a Th1 han sido descritas como las responsables de este alto grado de persistencia de la infección. El tratamiento con IFN induce una respuesta sostenida en alrededor del 30% de los pacientes con hepatitis crónica C. El mecanismo responsable de respuesta o no respuesta al tratamiento con IFN es poco conocido.

El sistema del IFN apenas ha sido estudiado en la infección crónica por el VHC. No existe un modelo animal apropiado de infección crónica por el VHC, por ello, los estudios realizados en humanos son la única fuente de información sobre la patofisiología y patogénesis de la hepatitis crónica C. En la presente invención se describe la expresión de los genes IFN α e IFN β en hígado y en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de controles sanos y pacientes con hepatitis crónica C. Además, hemos analizado el subtipo de IFN α expresado en tejido hepático normal y tejido hepático de pacientes con hepatitis crónica C. La expresión de los diferentes subtipos de IFN α también

- 4 -

fue analizada en CMSP de controles sanos y de pacientes con hepatitis crónica C.

BIBLIOGRAFIA

5

1. Maeyer E, Maeyer-Guignard J. Interferons. In Thomson A, ed. The Cytokine Handbook. London: Academic Press Limited 1991: 215-239.
2. Samuel CE. Antiviral Actions of Interferon. Interferon-Regulated Cellular Proteins and Their Surprisingly Selective Antiviral Activities. Virology 1991; 183: 1-11.
3. Tilg H. New Insights Into the Mechanisms of Interferon Alfa: An Immunoregulatory and Anti-inflammatory Cytokine. Gastroenterology 1997; 112: 1017-1021.
4. Tovey MG, Streuli M, Gresser I, Gugenheim J, Blanchard B, Guymarho J, Vignaux F and Gigou M. Interferon messenger RNA is produced constitutively in the organs of normal individuals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987; 84: 5038-5042.
5. Bisat F, Raj NB, Pitha PM. Differential and cell type specific expression of murine alpha interferon genes is regulated on the transcriptional level. Nucleic Acids Res 1988; 16: 6067-6083.
6. Hiscott J, Cantell K, Weissmann C. Differential expression of human interferon genes. Nucleic Acids Res 1984; 12: 3727-3746.
7. Au WC, Su Y, Raj NBK and Pitha PM. Virus-mediated Induction of Interferon A Gene Requires Cooperation between Multiple Binding Factors in the Interferon α Promoter Region. The Journal of Biological Chemistry 1993; 268: 24032-24040.

- 5 -

8. Aguet M, Grobke M, Dreiding P. Various human interferon alpha subclasses cross-react with common receptors: their binding affinities correlate with their specific biological activities. *Virology* 1984;132:211-216.
- 5 9. Foster GR, Rodrigues O, Ghouze F, Schulte-Frohlinde D, Testa D, Liao MJ, Stark GR, Leadbeater L, Thomas HC. Different relative activities of human cell derived interferon-alpha subtypes: interferon alpha 8 has very high antiviral potency. *J Interferon and Cytokine Res.* 10 1996;16:1027-1033.
10. Brandt ER, Linnane AW, Devenish RJ. Expression of IFN A genes in subpopulations of peripheral blood cells. *Br J Haematol* 1994; 86:717-725.
11. Gendelman HE, Friedman RM, Joe S, Baca LM, Turpin JA, 15 Dveksker G, Meltzer MS and Dieffenbach C. A Selective Defect of Interferon α Production in Human Immuno-deficiency Virus-infected Monocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 1990; 172: 1433-1442.
12. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of 20 liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 1997; 349:825-832.
13. Fattovich G, Giustina G, Degos F et al. Morbidity and Mortality in Compensated Cirrhosis Type C: A 25 Retrospective Follow-Up Study of 384 Patients. *Gastroenterology* 1997;112: 463-472.
14. Gil B; Qian Ch; Riezu-Boj JI, Civeira MP; Prieto J. Hepatic and extrahepatic HCV RNA strands in chronic hepatitis C: different patterns of response to inter- 30 feron treatment. *Hepatology* 1993;18:1050-1054.
15. Lopez S, Reeves R, Island ML, Bandu MT, Christeff N, Doly J and Navarro S. Silencer Activity in the

- 6 -

Interferon-A Gene Promoters. The Journal of Biological Chemistry 1997; 272: 22788-22799.

16. Knodell R, Ishak K, Black W, Chen T, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan T, et al. Formulation and application of a
5 numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. Hepatology 1981; 1:431-435.
17. Chomczynsky P; Sacchi N. Single-step of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform ex-
10 traction. Anal. Biochem. 1987;162:156-159.
18. Weissmann C, Weber H. The interferon genes. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 1986; 33:251-300.
19. Goeddel DV, Leung DW, Dull TJ, Gross M, Lawn RM., McCandliss R, Seeburg PH, Ullrich A, Yelverton E, Gray
15 PW. The structure of eight distinct cloned human leukocyte interferon cDNAs. Nature 1981; 290:20-26.
20. Derynck R, Content J, DeClercq E, Volckaert G, Tavernier J, Devos R, Fiers W. Isolation and structure of a human fibroblast interferon gene. Nature 1980;
20 285:542-547.
21. Ng SY, Gunning P, Eddy R, Ponte P, Leavitt J, Shows T, Kedes L. Evolution of the functional human b-actin gene and its multi-pseudogene family: conservation of noncoding regions and chromosomal dispersion of
25 pseudogenes. Mol Cell Biol 1985; 5:2720-2732.
22. Larrea E, Garcia N, Qian Ch, et al. Tumor Necrosis Factor α Gene Expression And The Response To Interferon In Chronic Hepatitis C. Hepatology 1996; 23: 210-217.
23. Viazov S; Zibert A; Ramakrishnan K; Widell A; Cavicchini A; Schreier E; Roggendord M. Typing of
30 hepatitis C virus isolates by DNA enzyme immunoassay. J. Virol. Methods 1994;48:81-92.

- 7 -

24. Sarobe P, Jauregui JI, Lasarte JJ, García N, Civeira MP, Borrás-Cuesta F and Prieto J. Production of interleukin-2 in response to synthetic peptides from hepatitis C virus El protein in patients with chronic hepatitis C: relationship with the response to interferon treatment. J Hepatol 1996;25:1-9.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

10 **Pacientes y controles**

La expresión génica de IFN α e IFN β fue analizada en muestras de biopsias hepáticas de 16 pacientes con hepatitis crónica C (9 hombres y 7 mujeres, rango de edad de 24 hasta 71 años). Cinco de estos pacientes presentaban cirrosis. El genotipo viral se determinó en 14 pacientes y resultó ser 1b en 10 pacientes, 1a en 2 pacientes y genotipo 3 en 1 paciente.

Además, la expresión génica de IFN α e IFN β fue determinada en 12 muestras de hígado normal obtenidas mediante laparatomía de 12 pacientes control (9 hombres y 3 mujeres, rango de edad de 49 hasta 70 años). La laparatomía fue realizada debido a la presencia de tumores digestivos en 10 pacientes (4 de colon-recto, 5 gástricos y 1 pancreático), debido a pancreatitis crónica en 1 paciente y a la presencia de quiste hiatídico en otro paciente. En los doce casos la histología hepática era normal. Ninguno de estos casos control había recibido tratamiento previamente a la obtención de la muestra hepática.

Los niveles de RNAm de IFN α e IFN β también fueron determinados en CMSP de 25 pacientes con hepatitis crónica C (14 hombres y 11 mujeres, rango de edad de 24 hasta 69 años) (cuatro de estos pacientes presentaban cirrosis) y en

- 8 -

CMSP de 23 controles sanos (10 hombres y 13 mujeres, rango de edad de 25 hasta 66 años). El genotipo viral de estos pacientes era 1b en 22 pacientes, 1a en dos pacientes y 3 en 1 paciente.

5 El diagnóstico de hepatitis crónica C se basó en una elevación de transaminasas séricas durante más de 6 meses, positividad para los anticuerpos anti-VHC (ELISA 2ª generación, Ortho Diagnostic System, Raritan, NJ, USA), presencia de RNA del virus C en suero (transcripción reversa-reacción
10 en cadena de la polimerasa), y evidencia histológica de hepatitis crónica. La severidad del daño hepático fue evaluado por el índice de Knodell (16). Fueron excluidas otras causas de hepatitis crónica diferentes al virus de la hepatitis C. Ninguno de los pacientes había recibido trata-
15 miento con IFN α durante, al menos, los 6 meses previos al estudio.

Preparación de las muestras hepáticas, CMSP y suero

Las muestras hepáticas fueron obtenidas mediante
20 biopsia hepática realizada con aguja de biopsia Tru-Cut (Baxter, Deerfield, IL). Un tercio de la muestra se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardó a -80°C hasta la extracción del RNA total. El resto de la muestra se utilizó para el estudio histológico.

25 Las CMSP se aislaron a partir de sangre heparinizada mediante un gradiente de densidad con Lymphoprep (Nycomed Pharma As, Oslo, Noruega), centrifugadas a 600 g durante 30 minutos. Después de la centrifugación, las CMSP fueron recogidas, lavadas 5 veces con ClNa al 0,9% y lisadas con la
30 solución desnaturalizante de proteínas Ultraspec™ (Biotech Laboratories, Houston, USA). El lisado celular fue guardado a -80°C hasta la extracción del RNA total que fue realizada según el método de Chomczynski y Sacchi (17).

- 9 -

Las muestras de suero fueron obtenidas mediante centrifugación a partir de sangre venosa recogida en tubos estériles. El suero se guardó a -40°C hasta su utilización.

5 **Análisis de la expresión génica de $\text{IFN}\alpha$ e $\text{IFN}\beta$ en hígado y CMSP**

Los niveles de RNAm de $\text{IFN}\alpha$ e $\text{IFN}\beta$ fueron determinados mediante un método cuantitativo de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), utilizando un
10 termociclador (Perkin-Elmer Gene Amp PCR system 2400). Previamente a la transcripción reversa, 2 μg de RNA total (tanto de hígado como de CMSP) fueron tratados con 1 unidad de desoxirribonucleasa (DNase I amplification grade, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) para eliminar el posible DNA
15 contaminante. La presencia de trazas de DNA fue chequeada incluyendo reacciones control sin transcripción reversa. Este paso es requerido debido a la ausencia de intrones en los genes de $\text{IFN}\alpha$ e $\text{IFN}\beta$ (18), lo que nos hace indistinguible el producto de PCR procedente del RNA o del posible DNA
20 contaminante. Todos los controles realizados sin transcripción reversa fueron negativos, indicando ausencia de DNA contaminante. El RNA total fue transcrito (60 minutos a 37°C) con 400 unidades de M-MuLV transcriptasa reversa (Gibco-BRL, Gaithersburg, Md, USA) en un volumen final de
25 40 μl de solución salina 5x (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl_2), suplementado con 5mM DTT, 0,5mM desoxirribonucleótidos trifosfato (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania), 48 unidades inhibidor de RNAsas (Promega Corporation, MD, US) y 400 ng de hexámeros aleato-
30 rios (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania). Después de desnaturalizar la transcriptasa reversa (95°C , 1 minuto) y rápidamente enfriar sobre hielo, una alícuota de 10 μl (0,5

- 10 -

µg) del cDNA fue utilizada para la amplificación de IFN α e IFN β por PCR en 50 µl de 10x bufer de PCR (160 mM (NH $_4$) $_2$ SO $_4$, 670 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% Tween 20) suplementado con los cebadores sentido y antisentido (40 ng de cada uno para IFN α y 60 ng para IFN β), 1,2 mM MgCl $_2$ y 2 unidades de BiotaqTM DNA polimerasa (Bioline, Londres, UK). En todos los experimentos fueron realizadas reacciones control sin RNA. Como control interno de cada muestra se realizaron ampliificaciones de un fragmento de cDNA β -actina, utilizando una alicuota de 10 µl del cDNA obtenido anteriormente. El IFN α fue amplificado realizando 30 o 33 ciclos (CMSP o hígado respectivamente) (94°C, 60°C y 72°C durante 20, 15, y 30 segundos cada paso respectivamente), el IFN β fue amplificado realizando 30 o 35 ciclos (CMSP o hígado respectivamente) (94°C, 58°C y 72°C durante 20, 15, y 30 segundos cada paso respectivamente) y la β -actina fue amplificada realizando 18 o 25 ciclos (PBMC o hígado respectivamente) (94°C, 55°C y 72°C durante 20, 15, y 30 segundos cada paso respectivamente), protocolos que evitan interferencias con la fase de saturación de la reacción de PCR. Los oligonucleótidos (5'-3') d(TCCATGAGATGATCCAGCAG) y d(ATTCTGCTCTGACAACCTCCC) fueron utilizados como cebadores sentido y antisentido, respectivamente, para amplificar un fragmento de 274 pares de bases localizado entre los nucleótidos 240-514 del gen humano del IFN α (19). Estos oligonucleótidos son cebadores consenso diseñados para amplificar todos los subtipos de IFN α . Los oligonucleótidos d(TCTAGCACTGGCTGGAATGAG) y d(GTTTCGGAGGTAACCTGTAAG) fueron los cebadores utilizados para amplificar un fragmento de 276 pares de bases localizado entre los nucleótidos 349-625 del cDNA del IFN β humano (20). d(TCTACAATGAGCTGCGTGTG) y

- 11 -

d(GGTGAGGATCTTCATGAGGT) fueron los cebadores utilizados para amplificar un fragmento de 314 pares de bases (nucleótidos 1319-2079) del gen de la β -actina (21).

Después de las reacciones de amplificación, 20 μ l del producto de PCR fueron corridos en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Las bandas obtenidas se visualizaron con una lámpara de luz ultravioleta y fueron analizadas con un programa comercial (Molecular Analyst/PC, Bio-Rad), capaz de digitalizar y analizar la imagen obtenida. Finalmente, los valores correspondientes a la expresión génica del IFN α o IFN β fueron normalizados con sus correspondientes de β -actina. Los resultados se expresaron como el cociente entre el valor de IFN α o IFN β y el correspondiente de β -actina. Previamente, nosotros demostramos que el RNAm de β -actina se expresaba constantemente tanto en hígado como en CMSP de pacientes con hepatitis crónica C (22), lo que nos permite normalizar los valores de IFN α e IFN β con los obtenidos de β -actina.

Se realizaron curvas de validación de la técnica de PCR partiendo de cantidades conocidas de RNA total (de 0 hasta 1 μ g). Como se observa en la figura 3, con las cantidades de RNA total inicial utilizadas para IFN α , IFN β o β -actina (0,5 μ g, tanto en hígado como en CMSP), nos encontramos en el rango lineal de la curva de amplificación de la PCR. El coeficiente de variación interensayo para IFN α / β -actina fue 22% y para IFN β / β -actina fue 24%. Se comprobó la identidad del producto de PCR obtenido para IFN α e IFN β mediante secuenciación automática (ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer, Perkin Elmer).

- 12 -

Identificación de los subtipos de IFN α

La extracción de RNA total, transcripción reversa y reacción de PCR se realizó como describimos anteriormente, utilizando los cebadores consenso de IFN α mencionados. El producto de PCR obtenido fue clonado utilizando el kit comercial de clonaje TOPO TA (Invitrogen, Leek, Holanda). Al menos 6 clones de cada inserto fueron secuenciados en un secuenciador automático ABI PRISM 310 (Perkin Elmer, Foster, CA), utilizando el kit de secuenciación Dye Rhodamine Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer, Foster CA).

Detección, cuantificación y genotipaje del RNA del virus C

La presencia del RNA del virus C en suero se determinó mediante la técnica de RT-PCR (14, 22), utilizando 2 pares de cebadores específicos de la región 5' no codificante del genoma del virus C. El RNA del virus C fue cuantificado mediante la técnica de PCR competitiva descrita por nosotros anteriormente (22). El genotipo viral fue determinado siguiendo el método de Viazov (23) y como anteriormente ya fue descrito (22,24). Para determinar el genotipo 4 se utilizó la sonda 5'G(A,G)CCGTCTGGGGCC(A,C)AAATGAT.

Análisis estadístico

Los resultados de IFN α e IFN β son presentados como la media \pm error standard. La normalidad de las variables fue estudiada con el test de Shapiro-Wilks. El análisis estadístico de los valores de IFN α e IFN β en CMSP o hígado se realizó con test no-paramétricos (Mann-Whitney U test) o paramétricos (T de Student). La asociación entre variables cuantitativas fue estudiada con el coeficiente de correlación de Pearson o Spearman, según correspondía. Para reali-

- 13 -

zar el análisis estadístico se utilizó el programa informático SPSS 6.0 de Windows.

Producción de proteína recombinante

5 Expresión y purificación de interferon- α 5 humano en *Escherichia coli*:

A pesar de que la expresión de cDNAs procedentes de organismos eucariotas en *Escherichia coli* asegura, en general, un alto nivel de producción, el aislamiento y purificación de la proteína de interés implica procedimientos complejos así como bajos rendimientos. Por esta razón, se utilizan vectores de expresión que facilitan la obtención de proteínas de fusión cuya purificación se reduce a un
15 paso de cromatografía de afinidad, de alto rendimiento y eficacia.

Construcción del vector de expresión y obtención de bacterias recombinantes

20 El cDNA que codifica para el interferon- α 5 se clonará en el vector pET14b (disponible comercialmente, Novagen). Este vector proporciona una secuencia que codifica para una serie de residuos de histidina (1 kDa) y que se traducirán en fase con el cDNA clonado para rendir una proteína de
25 fusión que contendrá en su extremo amino terminal una cola de histidinas de 1 kDa y a continuación el interferon- α 5, con un sitio de corte por trombina entre ambos.

Una vez obtenido el vector de expresión, se prepararán bacterias competentes de la cepa BL21(DE3) ya que esta cepa
30 contiene un gen inducible de la RNA polimerasa de T7, que será un requisito necesario para la posterior producción de proteína. Las bacterias competentes se transformarán con el

- 14 -

vector obtenido previamente (pET14b con el cDNA del interferon- α 5 clonado). Las bacterias transformadas se seleccionarán por su crecimiento en medio LB con ampicilina, ya que el vector contiene un gen de resistencia a este antibiótico.

Expresión y purificación del interferon- α 5:

Las bacterias transformadas se crecerán en medio LB con ampicilina a 37°C hasta una densidad óptica de 0,4 a 600 nm. A continuación se inducirá la expresión de la proteína recombinante con IPTG a una concentración final de 0.5 mM. De esta forma se induce el promotor lac y como consecuencia, el promotor de la RNA polimerasa de T7 que contiene el vector y que regula la expresión del cDNA clonado. El cultivo se crecerá 4 horas más en las mismas condiciones.

Para obtener los extractos, una vez crecidas las bacterias, se centrifugarán a 4°C. Las bacterias precipitadas se resuspenderán en un tampón Tris/HCl 10 mM, sacarosa 10%, 2-mercaptoetanol 2 mM e inhibidores de proteasas. La homogeneización se realizará por sonicación tras una incubación de 30 minutos con lisozima a 4°C. Esto permitirá romper la pared bacteriana y mejorar el rendimiento del proceso de extracción. El extracto citosólico se obtendrá a partir de la centrifugación del homogenado a 100.000 x g durante 90 minutos. La producción de proteína se verificará mediante el análisis de la fracción citosólica por SDS-PAGE.

La purificación de la proteína de fusión His-interferon- α 5 se purificará mediante la cromatografía del extracto citosólico en una columna de Niquel de 2 ml. Tras el lavado de la columna, la proteína se eluirá con 1 M imidazol. La proteína pura se procesará con trombina y el

- 15 -

interferon- $\alpha 5$ se repurificará posteriormente mediante cromatografía de exclusión molecular.

Expresión y purificación de interferon- $\alpha 5$ humano en *solanum tuberosum*:

Construcción del vector de expresión y obtención de plantas transgénicas

El cDNA que codifica para el interferon- $\alpha 5$ se clonará en un vector de expresión de *Agrobacterium tumefaciens*. Este vector contiene el promotor de la patatina (proteína más abundante en el tubérculo de *Solanum tuberosum*), además de una secuencia que codifica para una serie de residuos de histidina (1 kDa) y que se traducirán en fase con el cDNA clonado para rendir una proteína de fusión que contendrá en su extremo amino terminal una cola de histidinas de 1 kDa y a continuación el interferon- $\alpha 5$, con un sitio de corte por trombina entre ambos.

Una vez obtenido el vector de expresión, se prepararán bacterias competentes de la cepa GV2260 de *Agrobacterium tumefaciens*. Las bacterias competentes se transformarán con el vector obtenido previamente. Las bacterias transformadas se seleccionarán por su crecimiento en medio LB con kanamicina, ya que el vector contiene un gen de resistencia a este antibiótico.

Posteriormente se realizará un cocultivo de las bacterias transformadas con el material vegetal (hojas de *Solanum tuberosum* cultivadas *in vitro*) y se seleccionarán las células vegetales resistentes a kanamicina. Estas células se regenerarán hasta la obtención de plantas transgénicas.

Obtención y purificación del interferon- $\alpha 5$:

- 16 -

Se realizará una extracción de proteína total a partir de tubérculos de las plantas transgénicas que expresen el interferon- $\alpha 5$.

La purificación de la proteína de fusión His-interferon- $\alpha 5$ se realizará mediante la cromatografía del extracto proteico obtenido en una columna de Níquel de 2 ml. Tras el lavado de la columna, la proteína se eluirá con 1 M imidazol. La proteína pura se procesará con trombina y el interferon- $\alpha 5$ se repurificará posteriormente mediante cromatografía de exclusión molecular.

Subtipos de IFN α en tejido hepático normal y CMSP de individuos sanos

Después de la extracción del RNA total de las muestras de tejido hepático normal, el RNAm del IFN α fue amplificado utilizando cebadores universales para todos los subtipos de IFN α . Posteriormente, los productos de amplificación de PCR fueron clonados y secuenciados. Se analizaron 41 clones de cuatro hígados normales diferentes y observamos que la secuencia de IFN α de los 41 clones era la misma y correspondía al subtipo IFN $\alpha 5$ (Tabla 1). Estos resultados muestran que el IFN $\alpha 5$ es el único subtipo de IFN α expresado en hígado normal. La secuencia parcial de cADN de IFN alfa 5 obtenida para todos los clones se muestra como SEQ ID NO:1.

Para comparar el perfil de subtipos de IFN expresados en el hígado con el expresado en CMSP, se extrajo el RNA total de CMSP de 5 controles sanos y se amplificó el RNAm de IFN α con los cebadores universales de todos los subtipos de IFN α . De los 43 clones analizados, 15 correspondían al subtipo IFN $\alpha 5$, 14 al IFN $\alpha 1/13$, 6 al IFN $\alpha 21$ y 8 clones a otros subtipos de IFN α (Tabla 1). Estos resultados indican

- 17 -

que el perfil de subtipos de IFN α expresado en CMSP difiere del expresado en hígado normal.

Subtipos de IFN α en tejido hepático y CMSP de pacientes con hepatitis crónica C

Los resultados anteriores muestran que el hígado normal expresa IFN α 5, mientras que las CMSP expresan una variedad de subtipos de IFN α . En el parénquima hepático de pacientes con hepatitis crónica C existe infiltrado de células mononucleares, siendo éstas una fuente importante de IFN α . Ello sugiere que el perfil de subtipos de IFN α expresado en el hígado de pacientes con hepatitis crónica C podría diferir del perfil encontrado en hígado normal. Para estudiar la expresión de subtipos de IFN α en la hepatitis crónica C, extrajimos el RNA total de muestras hepáticas de 3 pacientes diferentes y de 2 muestras de CMSP. Después de amplificar el RNAm de IFN α con cebadores universales para todos los subtipos, clonamos y secuenciamos 24 clones de tejido hepático y 18 clones de CMSP. Como se muestra en la tabla 1, las CMSP de pacientes con hepatitis crónica C expresan IFN α 21, IFN α 5 y IFN α 7 (5, 12 y 1 clon respectivamente). En tejido hepático de estos pacientes encontramos además del subtipo IFN α 5, los subtipos IFN α 21, IFN α 17 y IFN α 1/13 (8, 1 y 2 clones respectivamente) (Tabla 1).

Estos datos sugieren que la producción de IFN α por el infiltrado de células mononucleares puede causar un cambio en el perfil de subtipos de IFN α expresados en el tejido hepático de pacientes con hepatitis crónica C.

Niveles de expresión de RNAm de IFN α en CMSP y en hígado de pacientes con hepatitis crónica C y controles

- 18 -

El RNA total fue extraído de muestras de CMSP e hígado de pacientes con hepatitis crónica C (n=25 y 16, respectivamente), de muestras de CMSP de controles sanos (n=20) y muestras de tejido hepático normal obtenidas mediante laparatomía (n=12). Los niveles de RNAm de IFN α fueron determinados mediante la técnica semicuantitativa de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), utilizando cebadores universales para amplificar todos los subtipos de IFN α . Los valores son expresados como el cociente entre el RNAm de IFN α /RNAm de β -actina.

Encontramos que los niveles de expresión de IFN α en CMSP de pacientes con hepatitis crónica C estaban significativamente aumentados comparados con los hallados en controles sanos ($3,2 \pm 0,48$ vs $1,14 \pm 0,26$; $p=0,001$) (Fig. 1A). Este resultado era esperado en una infección viral como la hepatitis C, en la que se encuentran infectadas las CMSP (14). Por el contrario, los niveles de expresión de RNAm de IFN α estaban significativamente disminuidos en tejido hepático de pacientes con hepatitis crónica C comparado con el expresado en hígado normal ($0,12 \pm 0,03$ vs $0,43 \pm 0,12$; $p=0,003$) (Fig 1B).

Como hemos observado anteriormente el IFN $\alpha 5$ es el único subtipo de IFN α detectado en hígado normal, mientras que en tejido hepático de pacientes con hepatitis crónica C se observa una mezcla de subtipos. Nuestros hallazgos indican que en la infección por VHC existe una marcada reducción en la expresión del subtipo de IFN α constitutivamente expresado en el tejido hepático. Interesantemente, los niveles de RNAm de IFN α en hígado de pacientes con hepatitis crónica C muestran una correlación directa con el índice de Knodell ($r=0,54$; $p<0,05$). Este hallazgo, junto con la observación

- 19 -

que los subtipos de IFN α detectados en hígado de pacientes con hepatitis crónica C son los observados en CMSP, sugiere que la mayor parte del RNAm de IFN α encontrado en hígado de hepatitis C proviene del infiltrado inflamatorio. Parece
5 posible que la reducción en la expresión del IFN α hepático (IFN α 5) pueda jugar un papel en la cronificación de la infección por VHC. Por ello, estas observaciones pueden tener implicaciones terapéuticas si además tenemos en cuenta la marcada actividad antiviral y antiproliferativa el
10 IFN α 5 descrita por otros autores (9).

Niveles de expresión de RNAm de IFN β en CMSP y en hígado de pacientes con hepatitis crónica C y controles

El IFN β , la segunda forma mayoritaria del interferon
15 tipo I, es una glicoproteína producida por un único gen. En las infecciones virales, los genes de IFN α e IFN β son activados o reprimidos transcripcionalmente a través de diversos mecanismos (15). Para analizar la expresión del IFN β en la hepatitis crónica C determinamos los niveles de RNAm de
20 IFN β en las mismas muestras de tejido hepático y CMSP que previamente habíamos determinado la expresión de IFN α .

Como se muestra en la figura 2, observamos que los niveles de RNAm de IFN β (expresados como cociente con sus respectivos de β -actina) eran significativamente más altos,
25 tanto en CMSP como en hígado, de pacientes con hepatitis crónica C comparados con los hallados en CMSP de controles sanos e hígados normales ($1,66 \pm 0,2$ vs $0,88 \pm 0,16$; $p=0,008$ en CMSP y $1,37 \pm 0,23$ vs $0,97 \pm 0,16$; $p=0,011$ en hígado). Estos resultados muestran que mientras el VHC causa represión del
30 IFN α en hígado, la expresión de IFN β está aumentada tanto en hígado como en CMSP. Ello indica que el VHC modula de

- 20 -

diferente forma los diferentes genes del IFN de tipo I en hígado, bloquea la producción de IFN α pero permite una sobreexpresión de IFN β .

5. **Relación entre la expresión de los genes de IFN α e IFN β con la carga viral, genotipo y daño hepático en la hepatitis crónica C**

Para determinar si la expresión génica del IFN α o IFN β pudiera estar relacionada con la carga viral o el genotipo, cuantificamos el RNA del virus C en suero de todos los pacientes mediante la técnica de PCR competitivo y determinamos el genotipo del VHC por un método de hibridación con sondas específicas. No encontramos correlación entre la expresión de los genes de IFN α o IFN β (en hígado o CMSP) y los niveles de RNA del virus C en suero o el genotipo viral.

Al analizar la relación entre la expresión de los genes de IFN tipo I y la intensidad de daño hepático en pacientes con hepatitis crónica C, encontramos que los niveles de RNAm de IFN β en hígado se correlacionaban directamente con los valores de aspartato aminotransferasa sérica ($r=0,64$, $p=0,008$), y con el índice de Knodell ($r=0,66$, $p=0,006$). De igual forma los valores de RNAm de IFN α en hígado mostraban una correlación directa y positiva con el índice de Knodell como mencionamos anteriormente.

- 21 -

Tabla 1. Subtipos de IFN α en controles y pacientes con hepatitis crónica C.

	Hígado	CMSP
Control 1	9 clones IFNA5	
Control 2	9 clones IFNA5	
Control 3	11 clones IFNA5	
Control 4	12 clones IFNA5	
Control 5		3 clones IFNA5 4 clones IFNA21 2 clones IFNA1
Control 6		8 clones IFNA5
Control 7		10 clones IFNA1/13 1 clon IFNA8
Control 8		3 clones IFNA5 2 clones IFNA21 2 clones IFNA1/13 1 clon IFNA22
Control 9		2 clones IFNA10 1 clon IFNA5 1 clon IFNA2 1 clon IFNA7 1 clon IFNA8 1 clon IFNA4
RNA-VHC (+) 1	6 clones IFNA5 2 clones IFNA21 1 clon IFNA17	7 clones IFNA5 1 clon IFNA21 1 clon IFNA7
RNA-VHC (+) 2	2 clones IFNA5 4 clones IFNA21	5 clones IFNA5 4 clones IFNA21
RNA-VHC (+) 3	5 clones IFNA5 2 clones IFNA21 2 clones IFNA1	

Descripción de las Figuras

Figura 1: Expresión de RNAm de interferon alfa/ β -actina (eje de ordenadas) en células mononucleares de sangre periférica (A) y en hígado (B), de controles sanos y pacientes con hepatitis crónica C (HCV-RNA +) (eje de abcisas).

Figura 2: Expresión de RNAm de interferon beta/ β -actina (eje de ordenadas) en células mononucleares de sangre periférica (A) y en hígado (B), de controles sanos (C) y pacientes con hepatitis crónica C (HCV-RNA +) (eje de abcisas).

Figura 3: Relación entre la cantidad inicial de RNA total (abcisas) y la intensidad de banda del producto de PCR obtenido tras la amplificación del RNAm de IFN α , (●) IFN β (▲) y β -actina (◆) (en ordenadas como cuentas x mm²) en muestras de CMSP (A) y de hígado (B).

REIVINDICACIONES

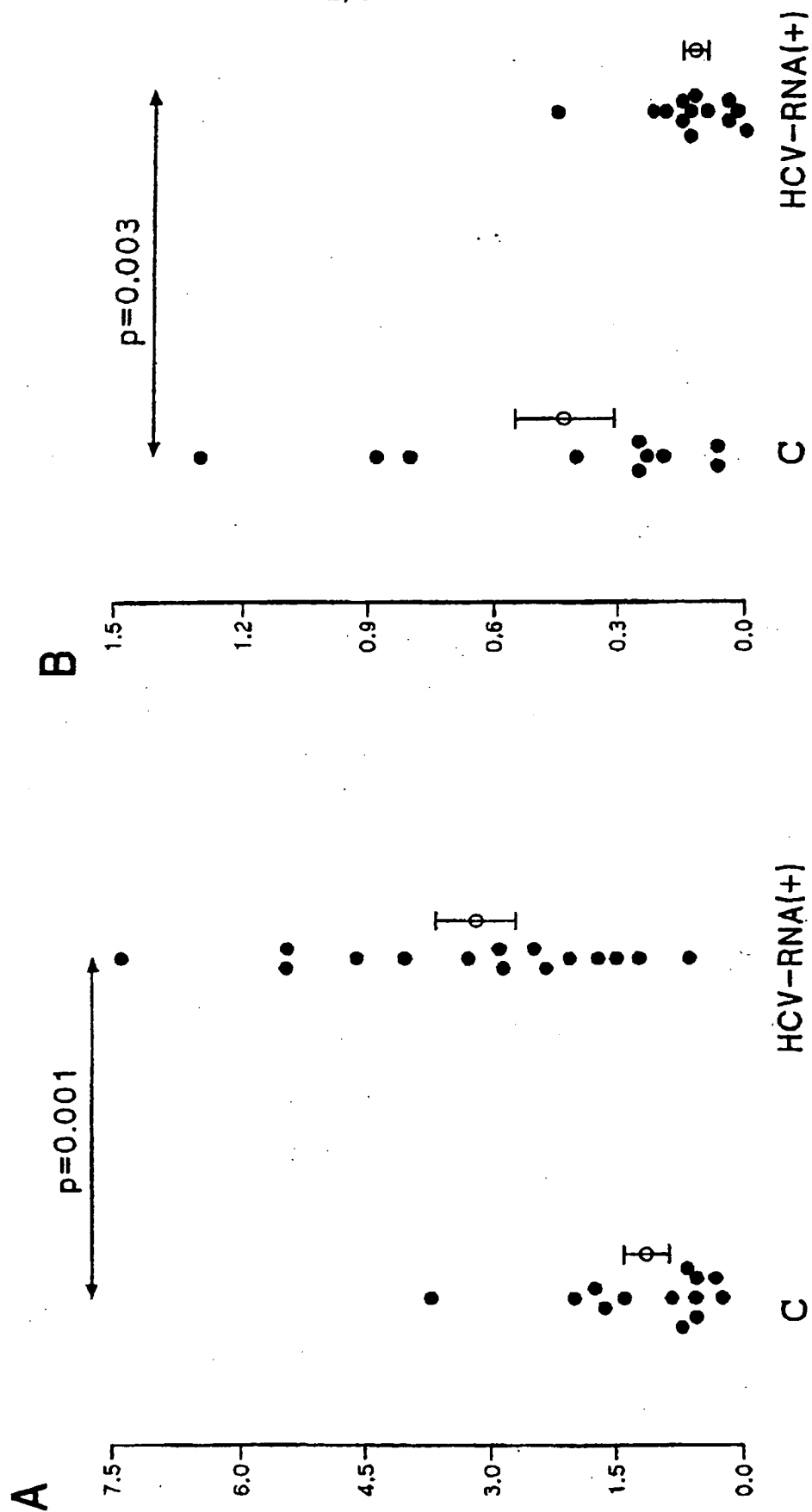
- 5 1.- Uso del IFN-alfa 5 o de la secuencia génica que lo codifica y/o sus secuencias génicas esencialmente derivadas, para la fabricación de composiciones útiles en el tratamiento de enfermedades hepáticas.
- 10 2.- Uso de acuerdo con la reivindicación 1, para la fabricación de composiciones útiles en el tratamiento de la hepatitis C crónica.
- 3.- Uso de acuerdo con la reivindicación 1, para la fabricación de composiciones útiles en el tratamiento de la cirrosis de origen viral.
- 15 4.- Uso de acuerdo con la reivindicación 1, para la fabricación de composiciones útiles en el tratamiento del carcinoma hepatocelular.
- 20 5.- Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la composición fabricada se utiliza para inducir genéticamente la síntesis fisiológica, dirigida a nivel nuclear, en células hepáticas enfermas deficitarias en dicha síntesis, de interferon alfa 5.
- 25 6.- Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la fabricación de la composición consiste en desarrollar una proteína recombinante de aplicación humana, mediante la clonación de un vector de expresión en un huésped apropiado.
- 30 7.- Uso de acuerdo con la reivindicación 6, en que el huésped clonado es un organismo eucariota, preferentemente *Escherichia Coli*.
- 8.- Uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el huésped clonado es un organismo procariota, preferentemente *Solanum tuberosum*.

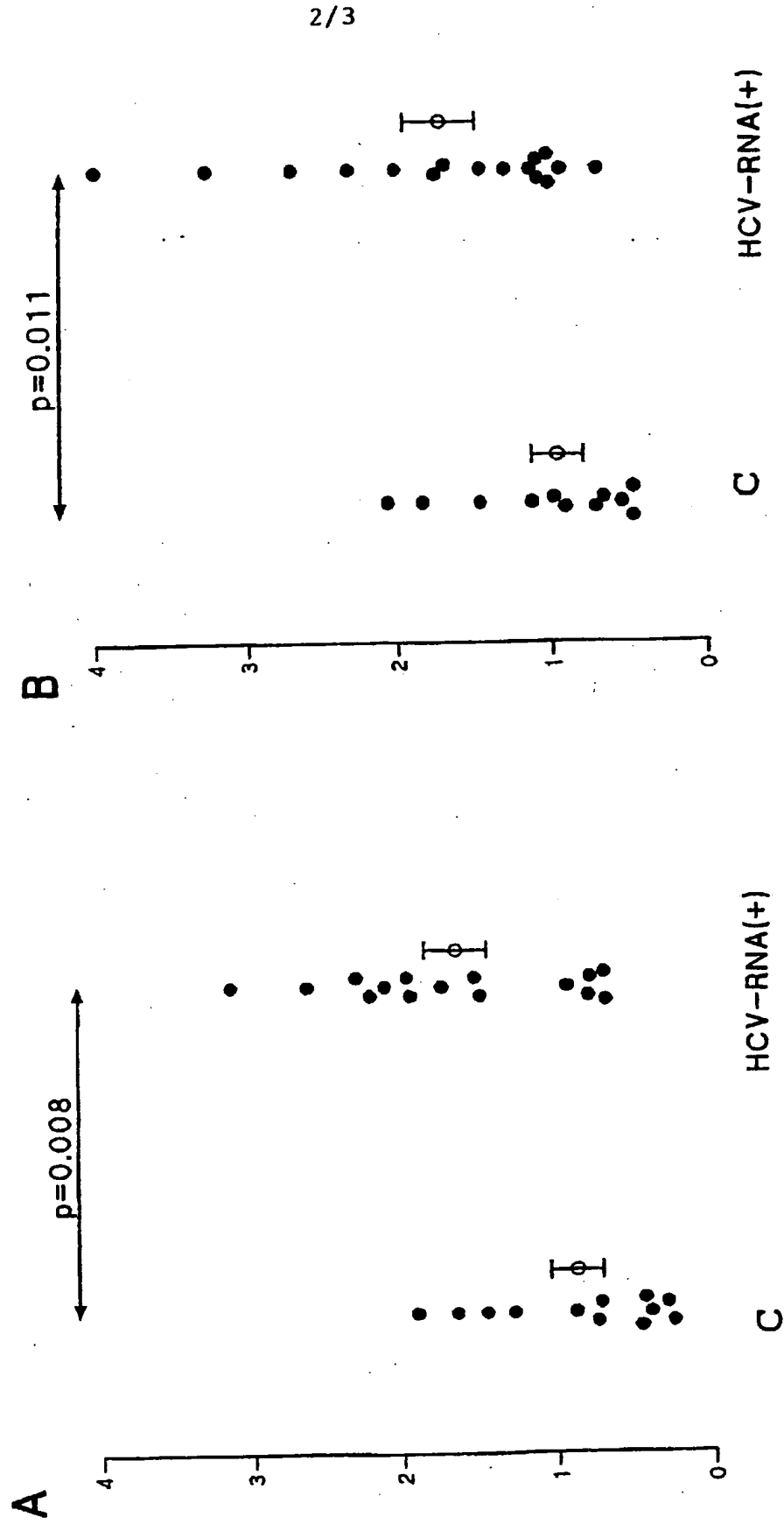
- 24 -

9.- Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que la composición fabricada es una composición ingerible como alimento.

10.- Uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4,
5 caracterizado en que la composición fabricada es una composición de terapia génica somática.

1/3





3/3

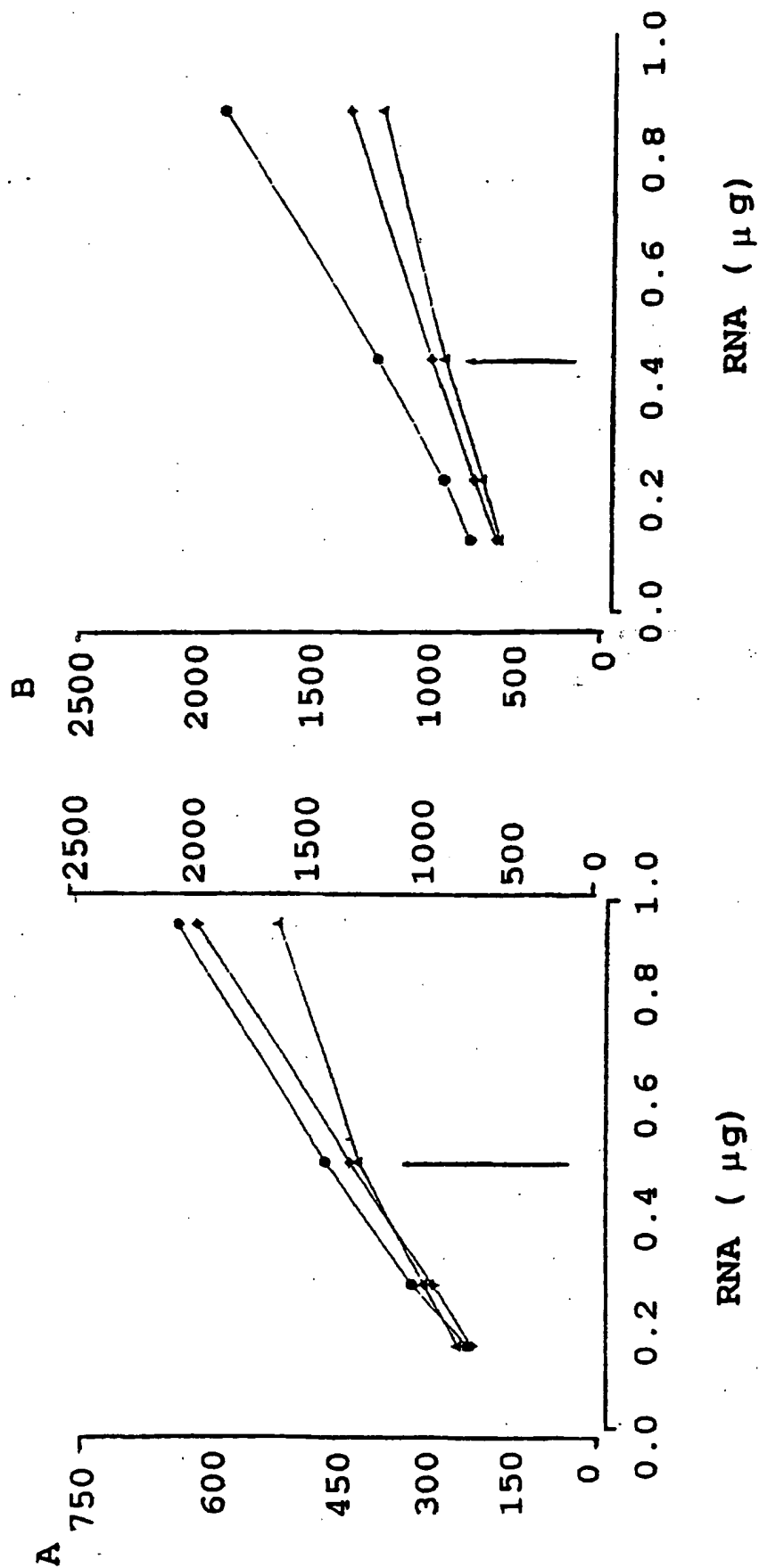


Figura 3

PCT

**NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES**

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

DE ELZABURU, Alberto
Miguel Angel, 21
E-28010 Madrid
ESPAGNE

ELZABURU	
Entrada	
30.11.99 054187	
ACH	

Date of mailing (day/month/year) 18 November 1999 (18.11.99)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference PCT-51			
International application No. PCT/ES99/00134	International filing date (day/month/year) 13 May 1999 (13.05.99)	Priority date (day/month/year) 13 May 1998 (13.05.98)	
Applicant INSTITUTO CIENTIFICO Y TECNOLOGICO DE NAVARRA, S.A. et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
AU,CN,EP,IL,JP,KP,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
AE,AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CU,CZ,DE,DK,EA,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IN,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,OA,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW
The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 18 November 1999 (18.11.99) under No. WO 99/58143

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/ ES 99/00134

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁶ A61K 38/21

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁶

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, CA, STRAND

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	FOSTER, G.R. et al., "Different relative activities of human cell-derived interferon-alpha subtypes: IFN- α 8 has very high antiviral potency". JOURNAL OF INTERFERON AND CYTOKINE RESEARCH, 1996, Vol. 16, No. 12, págs. 1027-1033	1,4,6,7,10
Y	Todo el documento	2,3
Y	DAVIS, G.L. et al., "Treatment of chronic hepatitis C with recombinant interferon alfa", THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, 1989, Vol. 321, No. 22, págs. 1501-1506	2,3
	Todo el documento	

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"T" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 3 Agosto 1999 (03.08.1999)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

13-08-99

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Funcionario autorizado

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.
n° de fax +34 91 3495304

JOSÉ LUIS VIZÁN
n° de teléfono + 34 91 3495524

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ ES 99/00134

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁶ A61K 38/21

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁶

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, CA, STRAND

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	FOSTER, G.R. et al., "Different relative activities of human cell-derived interferon-alpha subtypes: IFN- α 8 has very high antiviral potency". JOURNAL OF INTERFERON AND CYTOKINE RESEARCH, 1996, Vol. 16, No. 12, págs. 1027-1033 Todo el documento	1,4,6,7,10
Y	Todo el documento	2,3
Y	DAVIS, G.L. et al., "Treatment of chronic hepatitis C with recombinant interferon alfa", THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, 1989, Vol. 321, No. 22, págs. 1501-1506 Todo el documento	2,3

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 3 Agosto 1999 (03.08.1999)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

13-08-99

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.
nº de fax +34 91 3495304

Funcionario autorizado

JOSÉ LUIS VIZÁN

nº de teléfono + 34 91 3495524

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

VERSIÓN CORREGIDA

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional(43) Fecha de publicación internacional
18 de Noviembre de 1999 (18.11.1999)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 99/058143 A1(51) Clasificación Internacional de Patentes⁶: A61K 38/21

NAVARRA, S.A. [ES/ES]; Avenida Pío XII, 53, E-31008 Pamplona (ES).

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES99/00134

(72) Inventores; e

(22) Fecha de presentación internacional:
13 de Mayo de 1999 (13.05.1999)(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): PRI-
ETO VALTUEÑA, Jesús [ES/ES]; Tudela, 22 - 4°,
E-31002 Pamplona (ES). CIVEIRA MURILLO, M°
Pilar [ES/ES]; Irulanrea, 35 - 1°, E-31008 Pamplona
(ES). LARREA LEOZ, Esther [ES/ES]; Avenida Sancho
el Fuerte, 34 - 3° C, E-31008 Pamplona (ES).

(25) Idioma de presentación: español

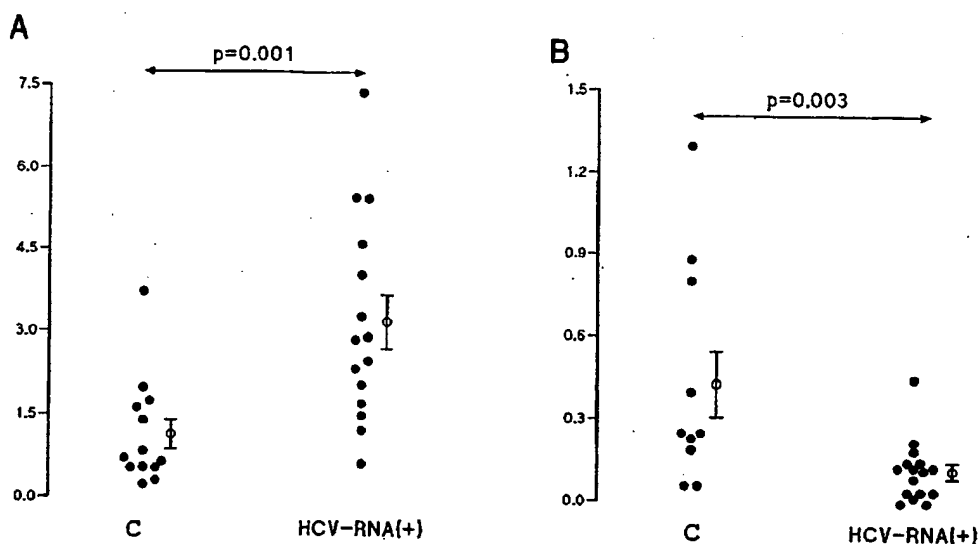
(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P 9801003 13 de Mayo de 1998 (13.05.1998) ES(74) Mandatario: DE ELZABURU, Alberto; Miguel Angel,
21, E-28010 Madrid (ES).(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
INSTITUTO CIENTIFICO Y TECNOLOGICO DE(81) Estados designados (nacional): AE, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: UTILIZATION OF INTERFERON ALPHA 5 IN THE TREATMENT OF VIRAL HEPATOPATHIES

(54) Título: USO DEL INTERFERON ALFA 5 EN EL TRATAMIENTO DE LAS HEPATOPATIAS VIRALES



(57) Abstract: The invention relates to the use of the interferon alpha 5 in the treatment of viral hepatopathies. The invention describes the reduced synthesis of IFN α 5 in the livers of patients with hepatitis C in comparison to healthy livers. The sub-type of IFN expressed in said healthy livers corresponded only to the sub-type alpha 5 in comparison with the different sub-types expressed in ill livers. The sequence SEQ ID NO:1 shows the partial sequence of cDNA corresponding to IFN α 5. These significant differences between the expression patterns of some livers and others demonstrate the importance of the use of such interferon sub-type in the fabrication of compositions useful in the treatment of viral hepatopathies. The invention discloses in details such utilization in different forms and processes, including those which use the production of recombinant proteins from sequences of the type SEQ ID NO:1.

[Continúa en la página siguiente]

WO 99/058143 A1

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(57) Resumen: La invención describe la síntesis disminuida de IFN α 5 en hígados de pacientes con hepatitis C, frente a hígados de controles sanos. El subtipo de IFN expresado en dichos hígados sanos, correspondió únicamente al subtipo alfa 5, frente a los diferentes subtipos expresados en hígados enfermos. En SEQ ID NO:1 se muestra la secuencia parcial de cADN correspondiente a IFN α 5. Estas diferencias significativas entre los patrones de expresión de unos hígados y otros ponen de manifiesto la importancia del uso de este subtipo de interferón en la fabricación de composiciones útiles en el tratamiento de hepatopatías de origen viral. En la invención se describe pormenorizadamente esta utilización bajo diferentes formas y procedimientos, incluyendo aquellos que utilizan la producción de proteínas recombinantes, a partir de secuencias tipo SEQ ID NO:1.

- 1 -

USO DEL INTERFERON ALFA 5 EN EL TRATAMIENTO DE LAS HEPATOPATIAS VIRALES

Ambito de la invención

5

La invención se relaciona con la producción de interferon alfa 5 para su utilización en composiciones útiles en el tratamiento de las hepatopatías de origen viral.

Hemos comprobado que el IFN-alfa 5 es el único subtipo
10 de interferon alfa producido en el hígado sano y que sus niveles se encuentran claramente descendidos en la hepatitis crónica C lo que pone de manifiesto el valor terapéutico de esta sustancia en el tratamiento de esta enfermedad y de otras hepatitis víricas. Al conocerse la secuencia
15 génica codificante de este interferon, la producción del mismo por tecnología de ADN recombinante en diferentes huéspedes, permite el desarrollo de fármacos eficaces para el tratamiento de este tipo de hepatopatías, en sus diferentes fases de evolución.

20

Estado de la técnica anterior

Las células infectadas pueden reconocer la presencia de virus iniciando señales que llevan a la transcripción y
25 secreción de interferon tipo I ($\text{IFN}\alpha$ e $\text{IFN}\beta$). El $\text{IFN}\alpha$ es una familia de 13 polipéptidos (subtipos) codificados por diferentes genes. El $\text{IFN}\beta$ es una glicoproteína producida por un único gen. Diversos tipos celulares producen tanto $\text{IFN}\alpha$ como $\text{IFN}\beta$ (1,2).

30

La infección viral es el principal estímulo para la producción de interferon tipo I, aunque también existen otros factores que pueden aumentar su síntesis, como son

- 2 -

componentes bacterianos, RNA de doble cadena, factores de crecimiento y otras citoquinas (1). Además de la acción antiviral del IFN α , éste puede interactuar con ciertas citoquinas y con las células T regulando el crecimiento y diferenciación de las células del sistema inmune (3). Los genes del IFN α son expresados constitutivamente en tejidos humanos de individuos sanos (4), aunque la expresión de determinados subtipos está restringida a ciertos tipos celulares (5,6). La inducción de IFN por virus es regulada principalmente a nivel transcripcional. La activación transcripcional específica ocurre por la interacción de factores celulares inducidos por virus con los dominios reguladores de los promotores de los genes del IFN α . (7).

Todos los subtipos de IFN α e IFN β poseen un receptor común en la superficie de las células. Ensayos de competición de unión al receptor de diversos subtipos de IFN α indican que todos ellos se unen al mismo receptor, pero con diferente afinidad (8). La actividad biológica de los diferentes subtipos de IFN α es poco conocida. Los subtipos de interferon IFN α 5 e IFN α 8 parecen ser los que tienen mayor actividad antiviral. La respuesta antiproliferativa también es diferente entre los diversos subtipos (9). En humanos, las células mononucleares de sangre periférica no estimuladas expresan diversos subtipos de IFN α (10).

Un mecanismo común de persistencia de la infección viral es la evasión del sistema del IFN. Muchos virus han desarrollado estrategias para evitar los efectos antivirales del IFN. Concretamente, un defecto selectivo en la producción de IFN α ha sido descrito en monocitos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (11).

- 3 -

El virus de la hepatitis C (VHC) es un virus RNA de cadena sencilla que conlleva a una infección crónica en más de dos tercios de las personas infectadas. La prevalencia de infección por el VHC es alrededor del 2 al 3% en la población occidental. Estudios desarrollados en Europa muestran que el 33% de los pacientes con infección crónica por el VHC desarrollan cirrosis en un tiempo medio inferior a 20 años (12). Una proporción significativa de estos pacientes desarrollan cáncer hepático, con una incidencia anual del 1,4% (13). Ha sido difícil encontrar la razón del alto grado de persistencia de la infección por el VHC. La alta tasa de mutaciones del virus y la producción de un perfil predominante de citoquinas Th2 respecto a Th1 han sido descritas como las responsables de este alto grado de persistencia de la infección. El tratamiento con IFN induce una respuesta sostenida en alrededor del 30% de los pacientes con hepatitis crónica C. El mecanismo responsable de respuesta o no respuesta al tratamiento con IFN es poco conocido.

El sistema del IFN apenas ha sido estudiado en la infección crónica por el VHC. No existe un modelo animal apropiado de infección crónica por el VHC, por ello, los estudios realizados en humanos son la única fuente de información sobre la patofisiología y patogénesis de la hepatitis crónica C. En la presente invención se describe la expresión de los genes IFN α e IFN β en hígado y en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de controles sanos y pacientes con hepatitis crónica C. Además, hemos analizado el subtipo de IFN α expresado en tejido hepático normal y tejido hepático de pacientes con hepatitis crónica C. La expresión de los diferentes subtipos de IFN α también

- 4 -

fue analizada en CMSP de controles sanos y de pacientes con hepatitis crónica C.

BIBLIOGRAFIA

5

1. Maeyer E, Maeyer-Guignard J. Interferons. In Thomson A, ed. The Cytokine Handbook. London: Academic Press Limited 1991: 215-239.
2. Samuel CE. Antiviral Actions of Interferon. Interferon-
10 Regulated Cellular Proteins and Their Surprisingly Selective Antiviral Activities. Virology 1991; 183: 1-11.
3. Tilg H. New Insights Into the Mechanisms of Interferon Alfa: An Immunoregulatory and Anti-inflammatory
15 Cytokine. Gastroenterology 1997; 112: 1017-1021.
4. Tovey MG, Streuli M, Gresser I, Gugenheim J, Blanchard B, Guymarho J, Vignaux F and Gigou M. Interferon messenger RNA is produced constitutively in the organs of normal individuals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987;
20 84: 5038-5042.
5. Bisat F, Raj NB, Pitha PM. Differential and cell type specific expression of murine alpha interferon genes is regulated on the transcriptional level. Nucleic Acids Res 1988;16:6067-6083.
- 25 6. Hiscott J, Cantell K, Weissmann C. Differential expression of human interferon genes. Nucleic Acids Res 1984;12:3727-3746.
7. Au WC, Su Y, Raj NBK and Pitha PM. Virus-mediated Induction of Interferon A Gene Requires Cooperation
30 between Multiple Binding Factors in the Interferon α Promoter Region. The Journal of Biological Chemistry 1993; 268: 24032-24040.

- 5 -

8. Aguet M, Grobke M, Dreiding P. Various human interferon alpha subclasses cross-react with common receptors: their binding affinities correlate with their specific biological activities. *Virology* 1984;132:211-216.
- 5 9. Foster GR, Rodrigues O, Ghouze F, Schulte-Frohlinde D, Testa D, Liao MJ, Stark GR, Leadbeater L, Thomas HC. Different relative activities of human cell derived interferon-alpha subtypes: interferon alpha 8 has very high antiviral potency. *J Interferon and Cytokine Res.* 10 1996;16:1027-1033.
10. Brandt ER, Linnane AW, Devenish RJ. Expression of IFN A genes in subpopulations of peripheral blood cells. *Br J Haematol* 1994; 86:717-725.
11. Gendelman HE, Friedman RM, Joe S, Baca LM, Turpin JA, 15 Dveksker G, Meltzer MS and Dieffenbach C. A Selective Defect of Interferon α Production in Human Immuno-deficiency Virus-infected Monocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 1990; 172: 1433-1442.
12. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. Natural history of 20 liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet* 1997; 349:825-832.
13. Fattovich G, Giustina G, Degos F et al. Morbidity and Mortality in Compensated Cirrhosis Type C: A 25 Retrospective Follow-Up Study of 384 Patients. *Gastroenterology* 1997;112: 463-472.
14. Gil B; Qian Ch; Riezu-Boj JI, Civeira MP; Prieto J. Hepatic and extrahepatic HCV RNA strands in chronic hepatitis C: different patterns of response to inter- 30 feron treatment. *Hepatology* 1993;18:1050-1054.
15. Lopez S, Reeves R, Island ML, Bandu MT, Christeff N, Doly J and Navarro S. Silencer Activity in the

- 6 -

- Interferon-A Gene Promoters. The Journal of Biological Chemistry 1997; 272: 22788-22799.
16. Knodell R, Ishak K, Black W, Chen T, Craig R, Kaplowitz N, Kiernan T, et al. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis. Hepatology 1981; 1:431-435.
17. Chomczynsky P; Sacchi N. Single-step of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 1987;162:156-159.
18. Weissmann C, Weber H. The interferon genes. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 1986; 33:251-300.
19. Goeddel DV, Leung DW, Dull TJ, Gross M, Lawn RM., McCandliss R, Seeburg PH, Ullrich A, Yelverton E, Gray PW. The structure of eight distinct cloned human leukocyte interferon cDNAs. Nature 1981; 290:20-26.
20. Derynck R, Content J, DeClercq E, Volckaert G, Tavernier J, Devos R, Fiers W. Isolation and structure of a human fibroblast interferon gene. Nature 1980; 285:542-547.
21. Ng SY, Gunning P, Eddy R, Ponte P, Leavitt J, Shows T, Kedes L. Evolution of the functional human b-actin gene and its multi-pseudogene family: conservation of noncoding regions and chromosomal dispersion of pseudogenes. Mol Cell Biol 1985; 5:2720-2732.
22. Larrea E, Garcia N, Qian Ch, et al. Tumor Necrosis Factor α Gene Expression And The Response To Interferon In Chronic Hepatitis C. Hepatology 1996; 23: 210-217.
23. Viazov S; Zibert A; Ramakrishnan K; Widell A; Cavicchini A; Schreier E; Roggendord M. Typing of hepatitis C virus isolates by DNA enzyme immunoassay. J. Virol. Methods 1994;48:81-92.

- 7 -

24. Sarobe P, Jauregui JI, Lasarte JJ, García N, Civeira MP, Borrás-Cuesta F and Prieto J. Production of interleukin-2 in response to synthetic peptides from hepatitis C virus E1 protein in patients with chronic hepatitis C: relationship with the response to interferon treatment. J Hepatol 1996;25:1-9.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

10 **Pacientes y controles**

La expresión génica de IFN α e IFN β fue analizada en muestras de biopsias hepáticas de 16 pacientes con hepatitis crónica C (9 hombres y 7 mujeres, rango de edad de 24 hasta 71 años). Cinco de estos pacientes presentaban cirrosis. El genotipo viral se determinó en 14 pacientes y resultó ser 1b en 10 pacientes, 1a en 2 pacientes y genotipo 3 en 1 paciente.

Además, la expresión génica de IFN α e IFN β fue determinada en 12 muestras de hígado normal obtenidas mediante laparatomía de 12 pacientes control (9 hombres y 3 mujeres, rango de edad de 49 hasta 70 años). La laparatomía fue realizada debido a la presencia de tumores digestivos en 10 pacientes (4 de colon-recto, 5 gástricos y 1 pancreático), debido a pancreatitis crónica en 1 paciente y a la presencia de quiste hiatídico en otro paciente. En los doce casos la histología hepática era normal. Ninguno de estos casos control había recibido tratamiento previamente a la obtención de la muestra hepática.

Los niveles de RNAm de IFN α e IFN β también fueron determinados en CMSP de 25 pacientes con hepatitis crónica C (14 hombres y 11 mujeres, rango de edad de 24 hasta 69 años) (cuatro de estos pacientes presentaban cirrosis) y en

- 8 -

CMSP de 23 controles sanos (10 hombres y 13 mujeres, rango de edad de 25 hasta 66 años). El genotipo viral de estos pacientes era 1b en 22 pacientes, 1a en dos pacientes y 3 en 1 paciente.

5 El diagnóstico de hepatitis crónica C se basó en una elevación de transaminasas séricas durante más de 6 meses, positividad para los anticuerpos anti-VHC (ELISA 2ª generación, Ortho Diagnostic System, Raritan, NJ, USA), presencia de RNA del virus C en suero (transcripción reversa-reacción
10 en cadena de la polimerasa), y evidencia histológica de hepatitis crónica. La severidad del daño hepático fue evaluado por el índice de Knodell (16). Fueron excluidas otras causas de hepatitis crónica diferentes al virus de la hepatitis C. Ninguno de los pacientes había recibido trata-
15 miento con IFN α durante, al menos, los 6 meses previos al estudio.

Preparación de las muestras hepáticas, CMSP y suero

Las muestras hepáticas fueron obtenidas mediante
20 biopsia hepática realizada con aguja de biopsia Tru-Cut (Baxter, Deerfield, IL). Un tercio de la muestra se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardó a -80°C hasta la extracción del RNA total. El resto de la muestra se utilizó para el estudio histológico.

25 Las CMSP se aislaron a partir de sangre heparinizada mediante un gradiente de densidad con Lymphoprep (Nycomed Pharma As, Oslo, Noruega), centrifugadas a 600 g durante 30 minutos. Después de la centrifugación, las CMSP fueron recogidas, lavadas 5 veces con ClNa al 0,9% y lisadas con la
30 solución desnaturalizante de proteínas Ultraspec™ (Biotech Laboratories, Houston, USA). El lisado celular fue guardado a -80°C hasta la extracción del RNA total que fue realizada según el método de Chomczynski y Sacchi (17).

- 9 -

Las muestras de suero fueron obtenidas mediante centrifugación a partir de sangre venosa recogida en tubos estériles. El suero se guardó a -40°C hasta su utilización.

5 **Análisis de la expresión génica de $\text{IFN}\alpha$ e $\text{IFN}\beta$ en hígado y CMSP**

Los niveles de RNAm de $\text{IFN}\alpha$ e $\text{IFN}\beta$ fueron determinados mediante un método cuantitativo de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), utilizando un
10 termociclador (Perkin-Elmer Gene Amp PCR system 2400). Previamente a la transcripción reversa, 2 μg de RNA total (tanto de hígado como de CMSP) fueron tratados con 1 unidad de desoxirribonucleasa (DNase I amplification grade, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA) para eliminar el posible DNA
15 contaminante. La presencia de trazas de DNA fue chequeada incluyendo reacciones control sin transcripción reversa. Este paso es requerido debido a la ausencia de intrones en los genes de $\text{IFN}\alpha$ e $\text{IFN}\beta$ (18), lo que nos hace indistinguible el producto de PCR procedente del RNA o del posible DNA
20 contaminante. Todos los controles realizados sin transcripción reversa fueron negativos, indicando ausencia de DNA contaminante. El RNA total fue transcrito (60 minutos a 37°C) con 400 unidades de M-MuLV transcriptasa reversa (Gibco-BRL, Gaithersburg, Md, USA) en un volumen final de
25 40 μl de solución salina 5x (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl_2), suplementado con 5mM DTT, 0,5mM desoxirribonucleótidos trifosfato (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania), 48 unidades inhibidor de RNAsas (Promega Corporation, MD, US) y 400 ng de hexámeros aleatorios
30 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Alemania). Después de desnaturalizar la transcriptasa reversa (95°C , 1 minuto) y rápidamente enfriar sobre hielo, una alícuota de 10 μl (0,5

- 10 -

µg) del cDNA fue utilizada para la amplificación de IFN α e IFN β por PCR en 50 µl de 10x bufer de PCR (160 mM (NH $_4$) $_2$ SO $_4$, 670 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% Tween 20) suplementado con los cebadores sentido y antisentido (40 ng de cada uno para IFN α y 60 ng para IFN β), 1,2 mM MgCl $_2$ y 2 unidades de BiotaqTM DNA polimerasa (Bioline, Londres, UK). En todos los experimentos fueron realizadas reacciones control sin RNA. Como control interno de cada muestra se realizaron ampliificaciones de un fragmento de cDNA β -actina, utilizando una alícuota de 10 µl del cDNA obtenido anteriormente. El IFN α fue amplificado realizando 30 o 33 ciclos (CMSP o hígado respectivamente) (94°C, 60°C y 72°C durante 20, 15, y 30 segundos cada paso respectivamente), el IFN β fue amplificado realizando 30 o 35 ciclos (CMSP o hígado respectivamente) (94°C, 58°C y 72°C durante 20, 15, y 30 segundos cada paso respectivamente) y la β -actina fue amplificada realizando 18 o 25 ciclos (PBMC o hígado respectivamente) (94°C, 55°C y 72°C durante 20, 15, y 30 segundos cada paso respectivamente), protocolos que evitan interferencias con la fase de saturación de la reacción de PCR. Los oligonucleótidos (5'-3') d(TCCATGAGATGATCCAGCAG) y d(ATTCTGCTCTGACAACCTCCC) fueron utilizados como cebadores sentido y antisentido, respectivamente, para amplificar un fragmento de 274 pares de bases localizado entre los nucleótidos 240-514 del gen humano del IFN α (19). Estos oligonucleótidos son cebadores consenso diseñados para amplificar todos los subtipos de IFN α . Los oligonucleótidos d(TCTAGCACTGGCTGGAATGAG) y d(GTTTCGGAGGTAACCTGTAAG) fueron los cebadores utilizados para amplificar un fragmento de 276 pares de bases localizado entre los nucleótidos 349-625 del cDNA del IFN β humano (20). d(TCTACAATGAGCTGCGTGTG) y

- 11 -

d(GGTGAGGATCTTCATGAGGT) fueron los cebadores utilizados para amplificar un fragmento de 314 pares de bases (nucleótidos 1319-2079) del gen de la β -actina (21).

Después de las reacciones de amplificación, 20 μ l del producto de PCR fueron corridos en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Las bandas obtenidas se visualizaron con una lámpara de luz ultravioleta y fueron analizadas con un programa comercial (Molecular Analyst/PC, Bio-Rad), capaz de digitalizar y analizar la imagen obtenida. Finalmente, los valores correspondientes a la expresión génica del IFN α o IFN β fueron normalizados con sus correspondientes de β -actina. Los resultados se expresaron como el cociente entre el valor de IFN α o IFN β y el correspondiente de β -actina. Previamente, nosotros demostramos que el RNAm de β -actina se expresaba constantemente tanto en hígado como en CMSP de pacientes con hepatitis crónica C (22), lo que nos permite normalizar los valores de IFN α e IFN β con los obtenidos de β -actina.

Se realizaron curvas de validación de la técnica de PCR partiendo de cantidades conocidas de RNA total (de 0 hasta 1 μ g). Como se observa en la figura 3, con las cantidades de RNA total inicial utilizadas para IFN α , IFN β o β -actina (0,5 μ g, tanto en hígado como en CMSP), nos encontramos en el rango lineal de la curva de amplificación de la PCR. El coeficiente de variación interensayo para IFN α / β -actina fue 22% y para IFN β / β -actina fue 24%. Se comprobó la identidad del producto de PCR obtenido para IFN α e IFN β mediante secuenciación automática (ABI PRISMTM 310 Genetic Analyzer, Perkin Elmer).

- 12 -

Identificación de los subtipos de IFN α

La extracción de RNA total, transcripción reversa y reacción de PCR se realizó como describimos anteriormente, utilizando los cebadores consenso de IFN α mencionados. El producto de PCR obtenido fue clonado utilizando el kit comercial de clonaje TOPO TA (Invitrogen, Leek, Holanda). Al menos 6 clones de cada inserto fueron secuenciados en un secuenciador automático ABI PRISM 310 (Perkin Elmer, Foster, CA), utilizando el kit de secuenciación Dye Rhodamine Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer, Forter CA).

Detección, cuantificación y genotipaje del RNA del virus C

La presencia del RNA del virus C en suero se determinó mediante la técnica de RT-PCR (14, 22), utilizando 2 pares de cebadores específicos de la región 5' no codificante del genoma del virus C. El RNA del virus C fue cuantificado mediante la técnica de PCR competitiva descrita por nosotros anteriormente (22). El genotipo viral fue determinado siguiendo el método de Viazov (23) y como anteriormente ya fue descrito (22,24). Para determinar el genotipo 4 se utilizó la sonda 5'G(A,G)CCGTCTTGGGGCC(A,C)AAATGAT.

Análisis estadístico

Los resultados de IFN α e IFN β son presentados como la media \pm error standard. La normalidad de las variables fue estudiada con el test de Shapiro-Wilks. El análisis estadístico de los valores de IFN α e IFN β en CMSP o hígado se realizó con test no-paramétricos (Mann-Whitney U test) o paramétricos (T de Student). La asociación entre variables cuantitativas fue estudiada con el coeficiente de correlación de Pearson o Spearman, según correspondía. Para reali-

- 13 -

zar el análisis estadístico se utilizó el programa informático SPSS 6.0 de Windows.

Producción de proteína recombinante

5 Expresión y purificación de interferon- α 5 humano en *Escherichia coli*:

A pesar de que la expresión de cDNAs procedentes de organismos eucariotas en *Escherichia coli* asegura, en general, un alto nivel de producción, el aislamiento y purificación de la proteína de interés implica procedimientos complejos así como bajos rendimientos. Por esta razón, se utilizan vectores de expresión que facilitan la obtención de proteínas de fusión cuya purificación se reduce a un paso de cromatografía de afinidad, de alto rendimiento y eficacia.

Construcción del vector de expresión y obtención de bacterias recombinantes

20 El cDNA que codifica para el interferon- α 5 se clonará en el vector pET14b (disponible comercialmente, Novagen). Este vector proporciona una secuencia que codifica para una serie de residuos de histidina (1 kDa) y que se traducirán en fase con el cDNA clonado para rendir una proteína de fusión que contendrá en su extremo amino terminal una cola de histidinas de 1 kDa y a continuación el interferon- α 5, con un sitio de corte por trombina entre ambos.

30 Una vez obtenido el vector de expresión, se prepararán bacterias competentes de la cepa BL21(DE3) ya que esta cepa contiene un gen inducible de la RNA polimerasa de T7, que será un requisito necesario para la posterior producción de proteína. Las bacterias competentes se transformarán con el

- 14 -

vector obtenido previamente (pET14b con el cDNA del interferon- α 5 clonado). Las bacterias transformadas se seleccionarán por su crecimiento en medio LB con ampicilina, ya que el vector contiene un gen de resistencia a este antibiótico.

Expresión y purificación del interferon- α 5:

Las bacterias transformadas se crecerán en medio LB con ampicilina a 37°C hasta una densidad óptica de 0,4 a 600 nm. A continuación se inducirá la expresión de la proteína recombinante con IPTG a una concentración final de 0.5 mM. De esta forma se induce el promotor *lac* y como consecuencia, el promotor de la RNA polimerasa de T7 que contiene el vector y que regula la expresión del cDNA clonado. El cultivo se crecerá 4 horas más en las mismas condiciones.

Para obtener los extractos, una vez crecidas las bacterias, se centrifugarán a 4°C. Las bacterias precipitadas se resuspenderán en un tampón Tris/HCl 10 mM, sacarosa 10%, 2-mercaptoetanol 2 mM e inhibidores de proteasas. La homogeneización se realizará por sonicación tras una incubación de 30 minutos con lisozima a 4°C. Esto permitirá romper la pared bacteriana y mejorar el rendimiento del proceso de extracción. El extracto citosólico se obtendrá a partir de la centrifugación del homogenado a 100.000 x g durante 90 minutos. La producción de proteína se verificará mediante el análisis de la fracción citosólica por SDS-PAGE.

La purificación de la proteína de fusión His-interferon- α 5 se purificará mediante la cromatografía del extracto citosólico en una columna de Níquel de 2 ml. Tras el lavado de la columna, la proteína se eluirá con 1 M imidazol. La proteína pura se procesará con trombina y el

- 15 -

interferon- α 5 se repurificará posteriormente mediante cromatografía de exclusión molecular.

Expresión y purificación de interferon- α 5 humano en *solanum tuberosum*:

Construcción del vector de expresión y obtención de plantas transgénicas

El cDNA que codifica para el interferon- α 5 se clonará en un vector de expresión de *Agrobacterium tumefaciens*. Este vector contiene el promotor de la patatina (proteína más abundante en el tubérculo de *Solanum tuberosum*), además de una secuencia que codifica para una serie de residuos de histidina (1 kDa) y que se traducirán en fase con el cDNA clonado para rendir una proteína de fusión que contendrá en su extremo amino terminal una cola de histidinas de 1 kDa y a continuación el interferon- α 5, con un sitio de corte por trombina entre ambos.

Una vez obtenido el vector de expresión, se prepararán bacterias competentes de la cepa GV2260 de *Agrobacterium tumefaciens*. Las bacterias competentes se transformarán con el vector obtenido previamente. Las bacterias transformadas se seleccionarán por su crecimiento en medio LB con kanamicina, ya que el vector contiene un gen de resistencia a este antibiótico.

Posteriormente se realizará un cocultivo de las bacterias transformadas con el material vegetal (hojas de *Solanum tuberosum* cultivadas *in vitro*) y se seleccionarán las células vegetales resistentes a kanamicina. Estas células se regenerarán hasta la obtención de plantas transgénicas.

Obtención y purificación del interferon- α 5:

- 16 -

Se realizará una extracción de proteína total a partir de tubérculos de las plantas transgénicas que expresen el interferon- $\alpha 5$.

La purificación de la proteína de fusión His-interferon- $\alpha 5$ se realizará mediante la cromatografía del extracto proteico obtenido en una columna de Níquel de 2 ml. Tras el lavado de la columna, la proteína se eluirá con 1 M imidazol. La proteína pura se procesará con trombina y el interferon- $\alpha 5$ se repurificará posteriormente mediante cromatografía de exclusión molecular.

Subtipos de IFN α en tejido hepático normal y CMSP de individuos sanos

Después de la extracción del RNA total de las muestras de tejido hepático normal, el RNAm del IFN α fue amplificado utilizando cebadores universales para todos los subtipos de IFN α . Posteriormente, los productos de amplificación de PCR fueron clonados y secuenciados. Se analizaron 41 clones de cuatro hígados normales diferentes y observamos que la secuencia de IFN α de los 41 clones era la misma y correspondía al subtipo IFN $\alpha 5$ (Tabla 1). Estos resultados muestran que el IFN $\alpha 5$ es el único subtipo de IFN α expresado en hígado normal. La secuencia parcial de cADN de IFN alfa 5 obtenida para todos los clones se muestra como SEQ ID NO:1.

Para comparar el perfil de subtipos de IFN expresados en el hígado con el expresado en CMSP, se extrajo el RNA total de CMSP de 5 controles sanos y se amplificó el RNAm de IFN α con los cebadores universales de todos los subtipos de IFN α . De los 43 clones analizados, 15 correspondían al subtipo IFN $\alpha 5$, 14 al IFN $\alpha 1/13$, 6 al IFN $\alpha 21$ y 8 clones a otros subtipos de IFN α (Tabla 1). Estos resultados indican

- 17 -

que el perfil de subtipos de IFN α expresado en CMSP difiere del expresado en hígado normal.

Subtipos de IFN α en tejido hepático y CMSP de pacientes con hepatitis crónica C

Los resultados anteriores muestran que el hígado normal expresa IFN α 5, mientras que las CMSP expresan una variedad de subtipos de IFN α . En el parénquima hepático de pacientes con hepatitis crónica C existe infiltrado de células mononucleares, siendo éstas una fuente importante de IFN α . Ello sugiere que el perfil de subtipos de IFN α expresado en el hígado de pacientes con hepatitis crónica C podría diferir del perfil encontrado en hígado normal. Para estudiar la expresión de subtipos de IFN α en la hepatitis crónica C, extrajimos el RNA total de muestras hepáticas de 3 pacientes diferentes y de 2 muestras de CMSP. Después de amplificar el RNAm de IFN α con cebadores universales para todos los subtipos, clonamos y secuenciamos 24 clones de tejido hepático y 18 clones de CMSP. Como se muestra en la tabla 1, las CMSP de pacientes con hepatitis crónica C expresan IFN α 21, IFN α 5 y IFN α 7 (5, 12 y 1 clon respectivamente). En tejido hepático de estos pacientes encontramos además del subtipo IFN α 5, los subtipos IFN α 21, IFN α 17 y IFN α 1/13 (8, 1 y 2 clones respectivamente) (Tabla 1).

Estos datos sugieren que la producción de IFN α por el infiltrado de células mononucleares puede causar un cambio en el perfil de subtipos de IFN α expresados en el tejido hepático de pacientes con hepatitis crónica C.

Niveles de expresión de RNAm de IFN α en CMSP y en hígado de pacientes con hepatitis crónica C y controles

- 18 -

El RNA total fue extraído de muestras de CMSP e hígado de pacientes con hepatitis crónica C (n=25 y 16, respectivamente), de muestras de CMSP de controles sanos (n=20) y muestras de tejido hepático normal obtenidas mediante laparatomía (n=12). Los niveles de RNAm de IFN α fueron determinados mediante la técnica semicuantitativa de transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), utilizando cebadores universales para amplificar todos los subtipos de IFN α . Los valores son expresados como el cociente entre el RNAm de IFN α /RNAm de β -actina.

Encontramos que los niveles de expresión de IFN α en CMSP de pacientes con hepatitis crónica C estaban significativamente aumentados comparados con los hallados en controles sanos ($3,2 \pm 0,48$ vs $1,14 \pm 0,26$; $p=0,001$) (Fig.1A). Este resultado era esperado en una infección viral como la hepatitis C, en la que se encuentran infectadas las CMSP (14). Por el contrario, los niveles de expresión de RNAm de IFN α estaban significativamente disminuidos en tejido hepático de pacientes con hepatitis crónica C comparado con el expresado en hígado normal ($0,12 \pm 0,03$ vs $0,43 \pm 0,12$; $p=0,003$) (Fig 1B).

Como hemos observado anteriormente el IFN $\alpha 5$ es el único subtipo de IFN α detectado en hígado normal, mientras que en tejido hepático de pacientes con hepatitis crónica C se observa una mezcla de subtipos. Nuestros hallazgos indican que en la infección por VHC existe una marcada reducción en la expresión del subtipo de IFN α constitutivamente expresado en el tejido hepático. Interessantemente, los niveles de RNAm de IFN α en hígado de pacientes con hepatitis crónica C muestran una correlación directa con el índice de Knodell ($r=0,54$; $p<0,05$). Este hallazgo, junto con la observación

- 19 -

que los subtipos de IFN α detectados en hígado de pacientes con hepatitis crónica C son los observados en CMSP, sugiere que la mayor parte del RNAm de IFN α encontrado en hígado de hepatitis C proviene del infiltrado inflamatorio. Parece
5 posible que la reducción en la expresión del IFN α hepático (IFN α 5) pueda jugar un papel en la cronificación de la infección por VHC. Por ello, estas observaciones pueden tener implicaciones terapéuticas si además tenemos en cuenta la marcada actividad antiviral y antiproliferativa el
10 IFN α 5 descrita por otros autores (9).

Niveles de expresión de RNAm de IFN β en CMSP y en hígado de pacientes con hepatitis crónica C y controles

El IFN β , la segunda forma mayoritaria del interferon
15 tipo I, es una glicoproteína producida por un único gen. En las infecciones virales, los genes de IFN α e IFN β son activados o reprimidos transcripcionalmente a través de diversos mecanismos (15). Para analizar la expresión del IFN β en la hepatitis crónica C determinamos los niveles de RNAm de
20 IFN β en las mismas muestras de tejido hepático y CMSP que previamente habíamos determinado la expresión de IFN α .

Como se muestra en la figura 2, observamos que los niveles de RNAm de IFN β (expresados como cociente con sus respectivos de β -actina) eran significativamente más altos,
25 tanto en CMSP como en hígado, de pacientes con hepatitis crónica C comparados con los hallados en CMSP de controles sanos e hígados normales ($1,66 \pm 0,2$ vs $0,88 \pm 0,16$; $p=0,008$ en CMSP y $1,37 \pm 0,23$ vs $0,97 \pm 0,16$; $p=0,011$ en hígado). Estos resultados muestran que mientras el VHC causa represión del
30 IFN α en hígado, la expresión de IFN β está aumentada tanto en hígado como en CMSP. Ello indica que el VHC modula de

- 20 -

diferente forma los diferentes genes del IFN de tipo I en hígado, bloquea la producción de IFN α pero permite una sobreexpresión de IFN β .

5 **Relación entre la expresión de los genes de IFN α e IFN β con la carga viral, genotipo y daño hepático en la hepatitis crónica C**

Para determinar si la expresión génica del IFN α o IFN β pudiera estar relacionada con la carga viral o el genotipo, 10 cuantificamos el RNA del virus C en suero de todos los pacientes mediante la técnica de PCR competitivo y determinamos el genotipo del VHC por un método de hibridación con sondas específicas. No encontramos correlación entre la expresión de los genes de IFN α o IFN β (en hígado o 15 CMSP) y los niveles de RNA del virus C en suero o el genotipo viral.

Al analizar la relación entre la expresión de los genes de IFN tipo I y la intensidad de daño hepático en pacientes con hepatitis crónica C, encontramos que los ni- 20 veles de RNAm de IFN β en hígado se correlacionaban directamente con los valores de aspartato aminotransferasa sérica ($r=0,64$, $p=0,008$), y con el índice de Knodell ($r=0,66$, $p=0,006$). De igual forma los valores de RNAm de IFN α en hígado mostraban una correlación directa y positiva con el 25 índice de Knodell como mencionamos anteriormente.

Tabla 1. Subtipos de IFN α en controles y pacientes con hepatitis crónica C.

	Hígado	CMSP
Control 1	9 clones IFNA5	
Control 2	9 clones IFNA5	
Control 3	11 clones IFNA5	
Control 4	12 clones IFNA5	
Control 5		3 clones IFNA5 4 clones IFNA21 2 clones IFNA1
Control 6		8 clones IFNA5
Control 7		10 clones IFNA1/13 1 clon IFNA8
Control 8		3 clones IFNA5 2 clones IFNA21 2 clones IFNA1/13 1 clon IFNA22
Control 9		2 clones IFNA10 1 clon IFNA5 1 clon IFNA2 1 clon IFNA7 1 clon IFNA8 1 clon IFNA4
RNA-VHC (+) 1	6 clones IFNA5 2 clones IFNA21 1 clon IFNA17	7 clones IFNA5 1 clon IFNA21 1 clon IFNA7
RNA-VHC (+) 2	2 clones IFNA5 4 clones IFNA21	5 clones IFNA5 4 clones IFNA21
RNA-VHC (+) 3	5 clones IFNA5 2 clones IFNA21 2 clones IFNA1	

Descripción de las Figuras

5 **Figura 1:** Expresión de RNAm de interferon alfa/ β -actina (eje de ordenadas) en células mononucleares de sangre periférica (A) y en hígado (B), de controles sanos y pacientes con hepatitis crónica C (HCV-RNA +) (eje de abcisas).

10 **Figura 2:** Expresión de RNAm de interferon beta/ β -actina (eje de ordenadas) en células mononucleares de sangre periférica (A) y en hígado (B), de controles sanos (C) y pacientes con hepatitis crónica C (HCV-RNA +) (eje de abcisas).

15 **Figura 3:** Relación entre la cantidad inicial de RNA total (abcisas) y la intensidad de banda del producto de PCR obtenido tras la amplificación del RNAm de IFN α , (●) IFN β (▲) y β -actina (◆) (en ordenadas como cuentas x mm²) en muestras de CMSP (A) y de hígado (B).

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Uso del IFN-alfa 5 o de la secuencia génica que lo codifica y/o sus secuencias génicas esencialmente derivadas, para la fabricación de composiciones útiles en el tratamiento de enfermedades hepáticas.
- 10 2.- Uso de acuerdo con la reivindicación 1, para la fabricación de composiciones útiles en el tratamiento de la hepatitis C crónica.
- 3.- Uso de acuerdo con la reivindicación 1, para la fabricación de composiciones útiles en el tratamiento de la cirrosis de origen viral.
- 15 4.- Uso de acuerdo con la reivindicación 1, para la fabricación de composiciones útiles en el tratamiento del carcinoma hepatocelular.
- 20 5.- Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la composición fabricada se utiliza para inducir genéticamente la síntesis fisiológica, dirigida a nivel nuclear, en células hepáticas enfermas deficitarias en dicha síntesis, de interferon alfa 5.
- 25 6.- Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la fabricación de la composición consiste en desarrollar una proteína recombinante de aplicación humana, mediante la clonación de un vector de expresión en un huésped apropiado.
- 30 7.- Uso de acuerdo con la reivindicación 6, en que el huésped clonado es un organismo eucariota, preferentemente *Escherichia Coli*.
- 8.- Uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el huésped clonado es un organismo procariota, preferentemente *Solanum tuberosum*.

- 24 -

9.- Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en que la composición fabricada es una composición ingerible como alimento.

10.- Uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4,
5 caracterizado en que la composición fabricada es una composición de terapia génica somática.

1/3

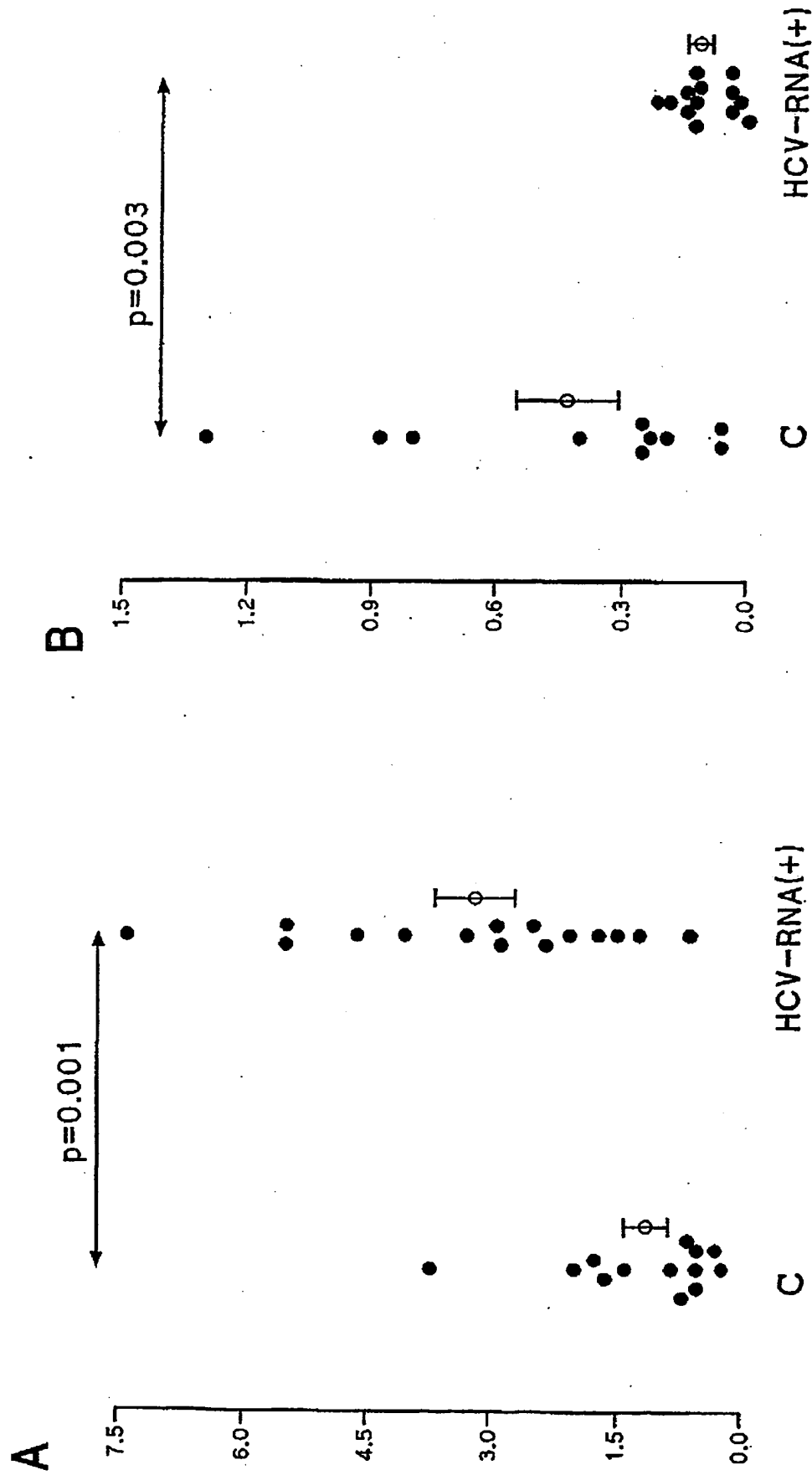


Figura 1

3/3

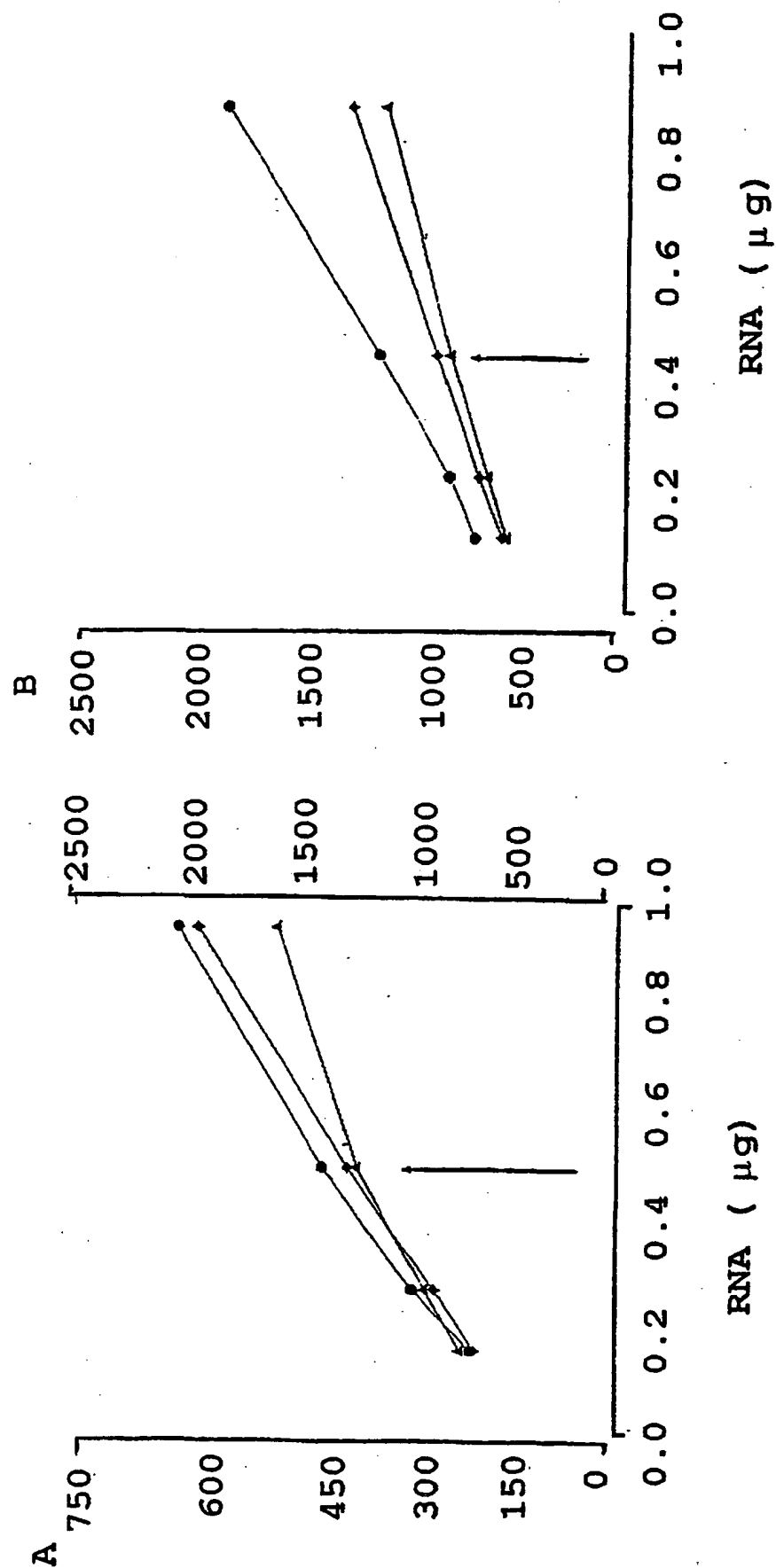


Figura 3

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> INSTITUTO CIENTIFICO Y TECNOLOGICO
 DE NAVARRA, S.A.

<120> "USO DEL INTERFERON ALFA 5 EN EL TRATAMIENTO DE
 LAS HEPATOPATIAS VIRALES".

<130> PCT-51

<150> ES 9801003

<151> 13.05.98

<160> 1

<210> SEQ ID NO.: 1

<211> 274 pares de bases

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<223> POSICION EN EL GENOMA: Cromosoma 9

<223> Nucleótidos 672 a 945 de la secuencia del gen de
 IFN α 5 publicada en la base de datos Genbank con
 número de acceso X02956.

<400>

TC CAT GAG ATG ATC CAG CAG ACC TTC AAT CTC TTC AGC ACA AAG GAC TCA	50
His Glu Met Ile Gln Gln Thr Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser	
1 5 10 15	
TCT GCT ACT TGG GAT GAG ACA CTT CTA GAC AAA TTC TAC ACT GAA CTT TAC	101
Ser Ala Thr Trp Asp Glu Thr Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr	
20 25 30	
CAG CAG CTG AAT GAC CTG GAA GCC TGT ATG ATG CAG GAG GTT GGA GTG GAA	152
Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Met Met Gln Glu Val Gly Val Glu	
35 40 45 50	
GAC ACT CCT CTG ATG AAT GTG GAC TCT ATC CTG ACT GTG AGA AAA TAC TTT	203
Asp Thr Pro Leu Met Asn Val Asp Ser Ile Leu Thr Val Arg Lys Tyr Phe	
55 60 65	
CAA AGA ATC ACC CTC TAT CTG ACA GAG AAG AAA TAC AGC CCT TGT GCA TGG	254
Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Thr Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp	
70 75 80	
GAG GTT GTC AGA GCA GAA AT	274
Glu Val Val Arg Ala Glu	
85 90	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES99/00134

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC⁶ A61K 38/21

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC⁶

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, CA, STRAND

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FOSTER, G.R. et al., "Different relative activities of human cell-derived interferon-alpha subtypes: IFN- α 8 has very high antiviral potency". JOURNAL OF INTERFERON AND CYTOKINE RESEARCH, 1996, Vol. 16, No. 12, pages 1027-1033	1,4,6,7,10
Y	The whole document	2,3
Y	DAVIS, G.L. et al., "Treatment of chronic hepatitis C with recombinant interferon alfa", THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, 1989, Vol. 321, No. 22, págs. 1501-1506	2,3
	The whole document	

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

03 August 1999 (03.08.99)

Date of mailing of the international search report

13 August 1999 (13.08.99)

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES99/00134

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SORIANO, V. Et al. "Interferon alpha for the treatment of chronic hepatitis C in patients infected with human immunodeficiency virus", CLINICAL INFECTIOUS DISEASES, 1996, Vol. 23, pages 585-591 The whole document	
A	MAUSS, S. Et al. "Response to treatment of chronic hepatitis C with interferon alpha in patients infected with HIV-1 is associated with higher CD4 + cell count", INFECTION, 1998, Vol. 26, No. 1, pages 16-19 The whole document	
A	SORIANO, V. Et al. "Efficacy and safety of alpha-interferon treatment for chronic hepatitis C in HIV - infected patients", JOURNAL OF INFECTION, 1995, Vol. 31, págs. 9-13 The whole document	
A	DI BISCEGLIE, A. Et al. "Recombinant interferon alpha therapy for chronic hepatitis C.", THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, 1989, Vol. 321, págs. 1506-1510. The whole document	

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/ES 99/00134

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁶ A61K 38/21

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁶

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, EMBASE, MEDLINE, BIOSIS, CA, STRAND

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	FOSTER, G.R. et al., "Different relative activities of human cell-derived interferon-alpha subtypes: IFN- α 8 has very high antiviral potency". JOURNAL OF INTERFERON AND CYTOKINE RESEARCH, 1996, Vol. 16, No. 12, págs. 1027-1033	1,4,6,7,10
Y	Todo el documento	2,3
Y	DAVIS, G.L. et al., "Treatment of chronic hepatitis C with recombinant interferon alfa", THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, 1989, Vol. 321, No. 22, págs. 1501-1506	2,3
	Todo el documento	

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 3 Agosto 1999 (03.08.1999)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

13-08-99

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Funcionario autorizado

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.
n° de fax +34 91 3495304

JOSÉ LUIS VIZÁN
n° de teléfono +34 91.3495524

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud interna

PCT/ ES99/00134

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES-		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	SORIANO, V. Et al. "Interferon alpha for the treatment of chronic hepatitis C in patients infected with human immunodeficiency virus", CLINICAL INFECTIOUS DISEASES, 1996, Vol. 23, págs. 585-591 Todo el documento	
A	MAUSS, S. Et al. "Response to treatment of chronic hepatitis C with interferon alpha in patients infected with HIV-1 is associated with higher CD4 + cell count", INFECTION, 1998, Vol. 26, No. 1, págs. 16-19 Todo el documento	
A	SORIANO, V. Et al. "Efficacy and safety of alpha-interferon treatment for chronic hepatitis C in HIV - infected patients", JOURNAL OF INFECTION, 1995, Vol. 31, págs. 9-13 Todo el documento	
A	DI BISCEGLIE, A. Et al. "Recombinant interferon alpha therapy for chronic hepatitis C.", THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, 1989, Vol. 321, págs. 1506-1510. Todo el documento	